

**Circadian-System-Phasen bezogene
Wirkungsabhängigkeit von Cortison auf das
circadiane System beim Menschen (asthmatischem Kind)
und Tier (Maus)**

Karl Wilhelm Maria Reindl

1975

Aus der Forschungsstelle für Soziale Pädiatrie und
Jugendmedizin der Universität München

Leiter: Prof. Dr. med. Theodor Hellbrügge

Circadian-System-Phasen bezogene Wirkungsabhängigkeit
von Cortison auf das circadiane System beim Menschen
(asthmatischem Kind) und Tier (Maus).

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karl Wilhelm Maria R e i n d l
aus
Bad Tölz

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Referent: Professor Dr. Th. Hellbrügge
Correferent: Professor Dr. K. Betke
Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 7. 1975



Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Studien zur Circadianen Periodik
des Cortisons

Circadian-System-Phasen bezogene Wirkungsabhängigkeit
von Cortison auf das circadiane System beim Menschen
(asthmatischen Kind) und Tier (Maus).

INHALTSVERZEICHNIS:

I.	Einführung	1
II.	Literaturübersicht	6
	Rhythmusabhängige Empfindlichkeitsreaktionen auf verschiedene Substanzen bei Tieren	7
A.	Circadian-System-Phasen abhängige Wirkung von Cortison beim Tier (Maus)	17
B.	Circadiane Periodizität beim Menschen	18
C.	Testung verschiedener Substanzen ein- schließlich Hormone auf das circadiane System beim Menschen	19
D.	Untersuchungen rhythmischer Erscheinungen beim Asthmatiker und allergisch Erkrankten	22
III.	Statistische Rechenmethoden und mathematische Verfahren zur Periodik-Analyse, insbesondere der Cosinor-Methode	26
IV.	Eigene Untersuchungen	41
A.	Klinische Beobachtungen	41
1.	Material und Methodik	41
a.	Auswahl	41
b.	Untersuchungsbedingungen	44

2. Biochemische Methoden	58
1. Biochemische Analyseverfahren in der klinischen Studie	58
2. Biochemische Analyseverfahren in der tierexperimentellen Studie	58
B. Tierexperimentelle Untersuchungen	61
1. Material und Methodik	61
a. Materialtest zur Granulomentwicklung in der Maus	61
b. Dosis-Wirkungs-Studie (DWS)	63
α . Auswahl	63
β . Untersuchungsbedingungen	64
γ . Testergebnisse verschiedener Cortisondosen	69
c. Solu-Medrol-Empfindlichkeits-Studie (SES)	77
α . Auswahl	77
β . Untersuchungsbedingungen und Operationstechnik	78
C. Ergebnisse	91
1. Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen	91
a. Vorstudie (DWS)	92
α . Körpergewichtsänderung	92
β . Organgewichtsänderung (Leber-Milz-Nebenniere)	93
γ . Rektaltemperaturänderung	93
b. Solu-Medrol-Empfindlichkeits-Studie (SES)	94
α . Acrophasen des Rektaltemperaturrhythmus	98
β . Acrophasenverschiebungen bei Organ-gewichtsrhythmen (Leber-Milz-Nebenniere)	105
γ . Acrophasenverschiebungen des Leber-glykogenrhythmus	117
δ . Konzentrationsänderungen im Serum- und Nebennieren-Corticosterongehalt	124

2.	Ergebnisse der klinischen Studie	132
a.	Circadiane Periodizität von Rektaltemperatur und Ausatemstoß (PEFR) bei asthmatischen Kindern	132
b.	Circadian-System-Phasen abhängige Wirkung auf Solu Medrol	136
	α . auf den PEFR-Rhythmus	136
	β . auf den K- und Cl-Ausschei- dungsrhythmus im Urin	144
V.	Diskussion	150
	Zusammenfassung und Schlußgedanke	169
	Erläuterungen und Definitionen	174
	Appendixtabellen	178
	Literaturverzeichnis	180
	Nachwort	201
	Lebenslauf	202

VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN:

Abb. 1	Übersicht über den physiologischen Spektralbereich	2
Abb. 2	Serumcorticosteronwerte bei ACTH behandelten C-Mäusen	10
Abb. 3	Nebennierencorticosterongehalt bei ACTH behandelten C-Mäusen	11
Abb. 4	Corticosteronzunahme in Serum und Nebennieren bei C-Mäusen nach Behandlung mit ACTH zu verschiedenen Phasen des circadianen Adrenalzyklus	12
Abb. 5	Cosinor-Methode	31
Abb. 6	Polarkoordinaten	33
Abb. 7	Vektorsummendiagramm	33
Abb. 8	Cosinorverfahren: Acrophasen und dazugehörige Amplituden im zweidimensionalen Diagramm	34
Abb. 9	Cosinorverfahren: Graphische Darstellung der Vertrauensbögen für Acrophase und Amplitude	35
Abb. 10	Medizinischer Untersuchungsgang im Zeitablauf bei Längs- und Querschnittsstudien an asthmatischen Kindern	42
Abb. 11	Physiologische Funktionen bei asthmatischen Kindern und zeitliche Anordnung der Quer- und Längsschnittuntersuchungen	45
Abb. 12	Schema der Längs- und Querschnittsstudien bei asthmatischen Kindern mit Intervallen der Datenaufzeichnung	49
Abb. 13	DWS: Körpergewichtsänderung bei C-Mäusen nach 8-tägiger Solu Medrol-"Einzelgaben"-Injektion	68
Abb. 14	DWS: Auszug aus Abb. 13	70

Abb. 15	DWS: Mittelwerte der Organgewichtsänderung bei C-Mäusen nach 8-tägiger Solu Medrol-"Einzelgaben"-Injektion	73
Abb. 16	DWS: Mittelwerte der Rektaltemperaturänderung bei C-Mäusen nach 8-tägiger Solu Medrol-"Einzelgaben"-Injektion	76
Abb.17,18, 19	SES: Mittelwerte der Körpergewichtsänderung 8 Tage vor Beginn, zu Beginn und 8 Tage nach Beginn einer Circadian-System-Phasen bezogenen Solu-Medrol-Injektion bei C-Mäusen	84, 86, 88
Abb. 20	Schema der täglichen Einzeldosen-Solu-Medrol Injektion bei C-Mäusen	89
Abb. 21	DWS: Chronogramm-Rektaltemperatur-Rhythmus	96
Abb. 22	SES: Mittelwerte der Rektaltemperatur bei C-Mäusen zwischen Beginn und Ende der Circadian-System-Phasen bezogenen Solu Medrol-Injektion	103
Abb. 23	SES: Mittelwerte der Lebergewichtsänderung bei C-Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol-Injektion	106
Abb. 24	SES: Chronogramm-Lebergewichtsrhythmus bei C-Mäusen	108
Abb. 25	SES: Mittelwerte der Milzgewichtsänderung bei C-Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol-Injektion	111
Abb. 26	SES: Chronogramm-Milzgewichtsrhythmus bei C-Mäusen	113
Abb. 27	SES: Mittelwerte der Nebennierengewichtsänderung bei C-Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol-Injektion	115
Abb. 28	SES: Chronogramm-Leberglykogen-Konzentrationsrhythmus bei C-Mäusen	119
Abb. 29	SES: Mittelwerte der Leberglykogenkonzentrationsänderung bei C-Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol-Injektion	120

Abb. 30	SES: Prozentualer Unterschied der Leberglykogenkonzentration zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen von C-Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol- oder Lösungsmittelinjektion	122
Abb. 31	SES: Prozentualer Abfall der Leberglykogenkonzentration zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen von C-Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol- oder Lösungsmittelinjektion	123
Abb. 32	SES: Serum Corticosteron-Konzentration bei C-Mäusen	125
Abb. 33	SES: Nebennieren Corticosteron-Gehalt bei C-Mäusen	126
Abb. 34	SES: Absolute Differenz der Serum-Corticosteron-Konzentration zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen von C-Mäusen	127
Abb. 35	SES: Absolute Differenz des Nebennieren-corticosteron-Gehalts zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen von C-Mäusen	128
Abb. 36	SES: Prozentualer Abfall der Nebennieren-Corticosteron-Konzentration zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen von C-Mäusen	129
Abb. 37	SES: Prozentualer Abfall der Serum-Corticosteron-Konzentration zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen von C-Mäusen	130
Abb. 38	Polarphasendiagramm circadianer Acrophase asthmatischer Kinder	135
Abb. 39	Behandlungseffekt einer Circadian-System-Phasen bezogenen Cortisontherapie bei schwer asthmatischen Kindern, ausgedrückt in % Änderung der Ausatemstoßwerte PEFR	138
Abb. 40	Phasenverschiebung $\Delta \emptyset$ des Circadian-Ausatemstoß Rhythmus als Funktion einer auf unterschiedliche Behandlungszeit bezogenen Langzeit-Corticosteroid-Therapie schwer asthmatischer Kinder	140

Abb. 41	Phasenverschiebung $\Delta\emptyset$ des Circadian-K-Ausscheidungs-Rhythmus im Urin als Funktion einer auf unterschiedliche Behandlungszeit bezogenen Langzeit-Corticosteroid-Therapie schwer asthmatischer Kinder	145
Abb. 42	Phasenverschiebung $\Delta\emptyset$ des Circadian-Cl-Ausscheidungs-Rhythmus im Urin als Funktion einer auf unterschiedliche Behandlungszeit bezogenen Langzeit-Corticosteroid-Therapie schwer asthmatischer Kinder	146
Abb. 43	Behandlungseffekt einer Circadian-System-Phasen bezogenen Cortisontherapie bei schwer asthmatischen Kindern ausgedrückt durch Verzögerung der circadianen Acrophase des K-Ausscheidungsrythmus im Urin	147
Abb. 44	Behandlungseffekt einer Circadian-System-Phasen bezogenen Cortisontherapie bei schwer asthmatischen Kindern ausgedrückt durch Verzögerung der circadianen Acrophase des Cl-Ausscheidungsrythmus im Urin	148
Abb. 45	Acrophase des Ausatemstoßes PEFR und Zeitschätzungsrythmus bei einem gesunden, 12 1/2-jährigen Mädchen	152

Tab. 1	Wirkung chemischer Substanzen auf Circadian-rhythmen beim Menschen und als Funktion der Circadian-System-Phase	20
Tab. 2	Schema Biometrischer- und Rhythmometrischer Analyseverfahren	27
Tab. 3	Kriterien zur Bewertung verabreichter Medikamente und zur Elimination von Atemstoßwerten, aufgezeichnet während der Wirkungs-dauer von ad hoc Medikation	53
Tab. 4	Übersicht der Versuchsanordnung der Solu Medrol DWS an C-Mäusen	65
Tab. 5	Zeitliche Folge der Untersuchungen an C-Mäusen in der DWS	66
Tab. 6	DWS: Mittelwerte der Körpergewichtsänderung bei C-Mäusen nach 8-tägiger Solu Medrol-"Einzelgaben"-Injektion	67
Tab. 7	DWS: Mittelwerte der Organgewichtsänderung (Leber, Milz, Nebenniere) bei C-Mäusen nach 8-tägiger Solu Medrol-"Einzelgaben"-Injektion	71
Tab. 8	DWS: Mittelwerte der Rektaltemperaturänderung bei C-Mäusen nach 8-tägiger Solu Medrol-"Einzelgaben"-Injektion	74
Tab. 9 10 11	SES: Mittelwerte der Körpergewichtsänderung 8 Tage vor Beginn, zu Beginn und 8 Tage nach Beginn einer Circadian-System-Phasen bezogenen Solu Medrol-Injektion bei C-Mäusen	81 - 83
Tab. 12	Cosinorergebnisse der DWS: Circadian-Acrophasen der Rektaltemperatur verschiedener Gruppen von C-Mäusen	95

Tab. 13	SES: Körpergewichtsänderung von C-Mäusen am 9. Tag der Circadian-System-Phasen bezogenen Solu Medrol-Injektion	99
Tab. 14	Cosinor-Ergebnisse der SES: Circadiane Acrophasen verschiedener Körperfunktionen bei C-Mäusen	100
Tab. 15, 16	SES: Mittelwerte der Rektaltemperatur bei C-Mäusen zwischen Beginn und Ende der Circadian-System-Phasen bezogenen Solu Medrol-Injektion	101, 102
Tab. 17	SES: Mittelwerte der Lebergewichtsänderung bei C-Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol-Injektion	107
Tab. 18	SES: Mittelwerte der Milzgewichtsänderung bei C-Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol-Injektion	112
Tab. 19	SES: Mittelwerte der Nebennierengewichtsänderung bei C-Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol-Injektion	114
Tab. 20	SES: Mittelwerte der Leberglykogenänderung bei C-Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol-Injektion	118
Tab. 21	Cosinor-Ergebnisse einer Transversalstudie an 3 Gruppen asthmatischer Kinder	133
Tab. 22	Cosinor-Ergebnisse externer und interner Circadian-Acrophasen der Rektaltemperatur und des Ausatemstoßes bei 3 Gruppen asthmatischer Kinder	134
Tab. 23	Statistische Berechnung der unterschiedlichen Cortisonwirkung bei asthmatischen Kindern - Fisher Test	139

App. Tab. 1	SES: Serum-Corticosteron-Bestimmung (B)	201
App. Tab. 2	SES: Nebennieren-Corticosteron- Bestimmung	202

EINFÜHRUNG

Tageszeitliche Veränderungen physiologischer und pathophysiologischer Funktionen sind in der Medizin beschrieben worden, seitdem naturwissenschaftliche Meßmethoden zur Grundlage der klinischen Diagnostik wurden.

Zusammenfassende Darstellungen dieser Erkenntnisse verdanken wir u.a. Jores (1935) und Menzel (1944). Danach waren schon bis zum Jahre 1962 bei mehr als 150 Funktionen ein Tag- und Nachtrhythmus bekannt.

Systematische Untersuchungen deckten auf, daß die tageszeitlichen Veränderungen der verschiedenen Funktionen nicht ausschließlich von der Umwelt abhängig waren, sondern daß ihnen endogene Biorhythmen zugrunde lagen. Da diese bezüglich der 24-Stunden-Periodik auf Werte um 24 h bestimmt werden konnten, prägte Halberg (1959) den Begriff der Circadianperiodik.

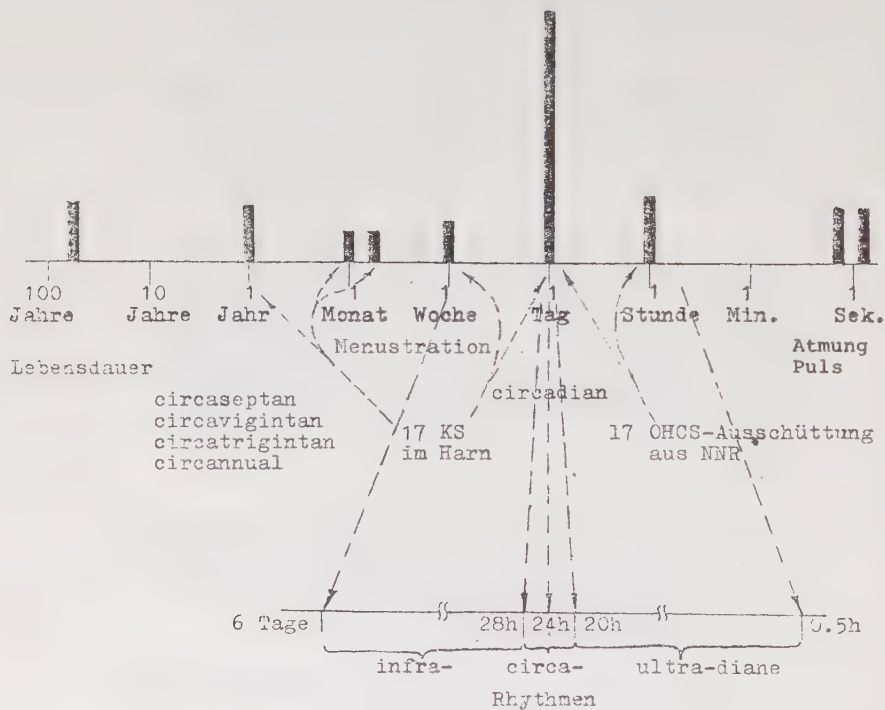
Während die Circadianperiodik im Bereich der Diagnostik bei den verschiedensten Funktionen eingehend untersucht wurde, fanden diese Erkenntnisse bislang noch kaum einen Niederschlag in der Therapie.

Die folgende Arbeit soll hierzu einen Beitrag liefern, wobei die Studien zur circadianen Periodik des Cortisols in den Mittelpunkt gestellt wurden. Bevor die Erkenntnisse aus der Literatur und die eigenen Untersuchungsergebnisse beschrieben werden, seien einige Informationen aus dem Bereich der Chronobiologie vorangestellt.

Abb. 1

PHYSIOLOGISCHER SPEKTRALBEREICH

(entnommen aus Halberg und Künkel 1968)



Die Abb. 1, entnommen aus der Arbeit von Halberg und Künkel (1968), stellt neben einer "makroskopischen" Zeitstruktur, wie Lebensdauer, Menstruation, Schlafen/Wachen, Atmung und Puls, eine "mikroskopische" Zeit-

struktur, z.B. die circadian- (von circa = ungefähr und dies = Tag; Halberg, 1959) rhythmische 17-OHCS-Ausschüttung der Nebennierenrinde deutlich dar.

Bald wurden Fragen nach der Abhängigkeit einer inneren Zeitstruktur biologischer Systeme von äußeren Synchronisatoren (Halberg et al., 1954) oder Zeitgebern (Aschoff, 1965) untersucht.

Hellbrügge (1960, 1965) forschte nach dem "Wann" eines circadian-rhythmischen Beginns physiologischer Funktionen im menschlichen Organismus, nachdem er beim Kind in der ersten Lebenszeit eine "innere Asynchronisation bzw. Dyssynchronisation" gefunden hatte (1967).

Neu entwickelte elektronische Rechenverfahren (Halberg et al., 1967 b) ermöglichen die Darstellung von Phasenlagen und -verschiebungen im circadian-periodischen System (unter Phase einer circadianen Funktion versteht man die Zeitspanne von 0.00 bis zum Auftreten des Maximalwertes der Funktion, gemessen in Winkelgraden; $24 \text{ h} = 360^\circ$).

Nachdem in einer großen Anzahl von Untersuchungen am Tier (Halberg et al., 1958 b, 1959 b, 1959 d, 1960 b; Haus et al., 1959; Marte et al., 1961; Ertel et al., 1964) erkannt wurde, daß die Phasenlage circadian-rhythmischer Funktionen zum Zeitpunkt der möglichen Schädigung des Organismus durch exogene Faktoren (physikalische, chemische, biochemische oder durch Bakterientoxine verursacht) für das Wohlbefinden oder die Erkrankung des betreffenden Organis-

mus eine ausschlaggebende Rolle spielen, ja sogar nach Halberg: "Die Phasen circadianer Systeme die Trennlinie zwischen Leben und Tod" (Haus, 1959; Halberg et al., 1959 b) darstellen, wandte man sich in zunehmendem Maße der klinischen Studie dieser Phänomene beim Menschen zu.

Der Einfluß chemischer Substanzen auf den circadianen Rhythmus verschiedener physiologischer Parameter wurde bei tageszeitlich unterschiedlicher Applikation derselben, zunächst am Gesunden und später auch in einzelnen Fällen (Reinberg, 1965 a,b; Reinberg et al., 1965, 1966) am Kranken geprüft.

Besondere Aufmerksamkeit fanden die Hormone, darunter besonders Cortison, das seit langem zur Behandlung allergischer (Chervinsky, 1968; Walsh et al., 1966; Marshall, 1965), arthritischer (Carter, 1965; Zuchner et al., 1964), dermatologischer (Wexler, 1968), nephritischer (Lange et al., 1958), neurologischer (Boines, 1961) und anderer Erkrankungen angewandt wird. Bei Applikation dieses Präparates wird ohne jeglichen Bezug zum Rhythmus, wie es bis heute der Fall war und zum Großteil noch ist, bei langer Medikationsdauer der kurative Effekt durch unangenehme und manchmal unerträgliche Nebenwirkungen beeinträchtigt (Zuchner et al., 1964; Johnson et al., 1965).

Es bleibt das Hauptanliegen der Klinik, die iatrogen verursachten Cortisontherapie-Nebeneffekte, wie Nebennierensuppression, Schwächung des Skelettsystems, Infektionsneigung und gastrointestinale Störungen (Walsh, 1966) zu kontrollieren und zu verringern.

Nachdem in Tierstudien und ersten Untersuchungen an Menschen eine circadianphasenabhängige Wirkungsände-

rung verschiedener Stoffe auf den Organismus bekannt wurden und Hinweise auf unterschiedlichen Wirkungseinfluß von Cortison auf den Nebennierenrhythmus (Belloni, 1968; Tarquini et al., 1966; Scalabrino, 1967; Grant et al., 1965; Di Raimondo et al., 1956, 1958; Segre et al., 1966; Nichols et al., 1965) vorlagen, wurde in dieser Arbeit die Frage gestellt, inwieweit eine Corticosteroidbehandlung zu unterschiedlichen Circadian-System-Phasen beim Asthmakranken und in ähnlicher Weise bei der C-Maus unterschiedliche Wirkungen und möglicherweise geringere Nebenwirkungen bedingt.

Neben den als klassisch beschriebenen Wirkungen der Corticosteroide (Turner, 1964; Kuschinsky, 1967; Selye, 1956) wurde hier die Induktion von Rhythmusänderungen, wie Phasenverschiebung (Martin et al., 1964; Haus et al., 1967) bewertet. Mögliche Wirkungen der "Zeit-Therapie" auf andere Rhythmusparameter als die Acrophasen, wie z.B. die Amplitude C oder das rhythmusbezogene Niveau C_0 , wurden zudem in Betracht gezogen, da sie ebenfalls Einsicht in die zeitliche Organisation (Ertel et al., 1964; Halberg et al., 1955 a,b; 1958 b, 1959 b, 1959 d; Haus et al., 1959; Jones et al., 1963; Marte et al., 1961; Reinberg, 1965; Reinberg et al., 1963, 1965; Scheving, 1968) physiologischer Funktionen geben und einem circadianen Empfindlichkeitsrhythmus zugrunde liegende Mechanismen aufdecken helfen.

LITERATUR - ÜBERSICHT

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Studie über die Circadian-System-Phasen bezogene Wirkung von Methylprednisolon, einem Glucocorticoid, auf die Rhythmizität verschiedener physiologischer Variablen bei der Maus und dem asthmatischen Kind, wurden folgende Fragen an die Literatur gestellt:

- 1) Sind chemische Substanzen und/oder Hormone, speziell Cortison, in ihrer Wirkung auf das Circadian-System beim Tier, besonders der Maus, untersucht worden ?
- 2) Wurden beim Menschen, insbesondere beim Asthmatiker, Veränderungen des Circadian-Rhythmus verschiedener physiologischer Parameter durch
 - a) die Krankheit selbst, und
 - b) durch unterschiedliche, zeitliche oder Circadian-System-Phasen bezogene Exposition zu chemischen Substanzen oder Applikation von Medikamenten, Hormonen, speziell Cortison, bekannt ?

Die Frage nach einer circadianen Wirksamkeit therapeutischer Maßnahmen wird besonders nach Kenntnis circadianer Vorgänge im Tier-Organismus und beim Menschen, sowie nach der Entwicklung moderner, elektronischer Analyseverfahren (Cosinor) zur Quantifizierung von Rhythmen, in zunehmendem Maße gestellt.

Es war erstmals im Jahre 1861, daß Smith (1861) in der Reaktion der menschlichen Natur auf medizinische Zubereitungen, auf Medikamente, eine Abhängigkeit von, "daily cycle", täglichen Rhythmen der "Vitalität" vermutete.

Immer mehr wurden in den letzten Jahren circadian- (Halberg, 1960 d, 1963, 1969a; Halberg et al., 1955a,b, 1967; Reinberg, 1965), circaannual- (Haus et al., 1970) und anders rhythmische (Halberg et al., 1969) Empfindlichkeits-Reaktionen auf verschiedene Agentien, einschließlich chemischer Substanzen, wie Medikamente und Gifte, verschiedener Organismen, besonders bei Tieren und beim Menschen, untersucht.

Rhythmusabhängige Empfindlichkeitsreaktionen bei Tieren:

In einer Zell-Studie zeigten Dobrokhotov et al. (1964) die Wirkung von Sarkolysin auf die Änderung der Mitoseaktivität und den diurnalen Mitoserhythmus im normalen Gewebe bei Ratten, in Abhängigkeit der Injektionszeit.

Ratten wurde Sarkolysin (12 mg pro kg Körpergewicht) während Perioden maximaler und minimaler Aktivität des Gewebes i.p. injiziert. 4 Stunden nach der Injektion des Agens wurden die Tiere getötet und dann alle 4 Stunden im Gewebe der Cornea, des Oesophagus und in verschiedenen Zonen der Nebennierenrinde, Mitosen gezählt. Es fanden sich unterschiedliche Wirkungen des Sarkolysins auf die Mitoseaktivität der verschiedenen Gewebe. Wurde Sarkolysin während der Periode minimaler Mitoseaktivität injiziert, so resultierte in den Zellen der Leber und des Colon eine Umkehr der diurnalen Mitoseperiodizität. Der Mitose-Index des Corneaepithels unbehandelter Tiere war 8,41; wurde Sarkolysin während der Periode maximaler Mitoseaktivität gegeben, so senkte sich der Index auf 8,03; während der Periode minimaler Aktivität stieg er auf 9,03.

Schewing et al. wiesen 1965 eine 24-h-Periodizität der Aufnahme tritiumhaltigen Thymidins und seiner Abhängigkeit

von der Mitose-Rate in der Epidermis bei Urodele-Larven nach.

In einer späteren Untersuchung zeigten Schewing et al. (1973) Phasenänderungen des Corneaepithel-Mitose-Index-Rhythmus durch verschiedene Medikamente. Es wurde gefunden, daß die Wirkung des Anti-Metaboliten-Arabinosyl-Cytosin abhängig war von der Phase des Circadian-Systems. Gab man das Agens in der Acrophase des Mitose-Index-Rhythmus des Corneaepithels, so resultierte im darauffolgenden Zyklus kein Effekt. Wurde die gleiche Dosis zur Zeit des niedrigsten Mitose-Index gegeben, so war der Mitosegipfel im nachfolgenden Zyklus um etwa 4 Stunden-Phasen verschoben, nämlich verzögert, und die Wellenform des Rhythmus war verändert.

Ähnliche Verhältnisse wurden bei der Maus nach Gabe von Isoproterenol (IPR) gefunden (Schewing et al., 1973). Wurde IPR während des Minimums des Mitose-Index verabreicht, so eilte der Gipfel im folgenden Zyklus um 8 Stunden voraus und die Kurve erschien bei fixiert bleibendem Minimum verändert. Die beiden weiteren darauffolgenden circadianen Zyklen waren ebenfalls verändert. Wurde nun aber IPR zum Zeitpunkt des Maximums des Mitose-Index gegeben, so blieben die beiden nachfolgenden Zyklen in der Phase den Kontrollen ähnlich. Nur der dritte erwartete Mitosegipfel eilte in seiner Phase voraus.

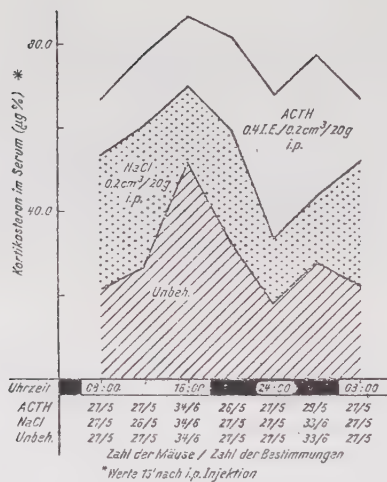
Aufbauend auf der Kenntnis eines physiologischen Funktionsrhythmus von annähernd 24-h-Periodendauer der Nebenniere hatten Haus (1961) und Haus et al. (1962) circadiane Aspekte der Nebennierenreaktion auf unspezifische Stimulationen und ACTH-Einfluß hin untersucht.

Der Funktionsrhythmus der Nebennierenrinde, der sich direkt biochemisch in circadianen Schwankungen des Corticoidspiegels im Blut (Halberg et al., 1959 a; Guillemín et al., 1959; Doe et al., 1954) und in zeitlich entsprechenden Schwankungen der Harnausscheidung von 17-Ketosteroiden (Pinkus, 1943; Halberg et al., 1959a; Doe et al., 1954) und Corticosteroiden (Migeon et al., 1956) fassen ließ, war schon vorher beim Menschen und in der Maus nachgewiesen worden (Halberg et al., 1958a, 1959a,c).

Ohne einen weiteren Stimulus, außer dem exogenen Rhythmus des Tag-Nacht-Wechsels ("Synchronizer, Zeitgeber"), konnte ebenfalls ein täglicher Corticosteronrhythmus im Gewebe der Nebenniere gefunden werden, dessen Maximum mit dem des Corticosteronspiegels im Serum in etwa zusammenfiel. Es war eine Korrelation zwischen der physiologischen, circadianen Änderung des Corticosterongehalts in der Nebenniere und im Serum statistisch signifikant nachgewiesen worden. Halberg et al. (1961a) stellten einen circadian-periodischen Anstieg der 17-Hydroxicorticosteroide im Plasma -bei ungestörten Versuchspersonen wurden über einen intravenösen Dauerkatheter Blutproben entnommen- in den frühen Morgenstunden, also vor Beginn der täglichen Aktivitätsperiode, fest. Der elektroenzephalographisch kontrollierte Schlaf der Versuchspersonen ließ den Schluß zu, daß der Adrenalzyklus nicht unmittelbare Folge eines Schlaf-Wach-Wechsels ist.

Abb. 2

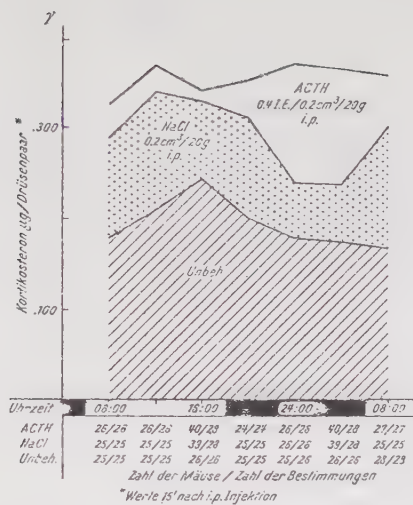
(entnommen aus Haus und Halberg, 1962)



Serumcorticosteronwerte in C-Mäusen mit oder ohne vorangehender Behandlung mit physiologischer NaCl-Lösung oder ACTH.

Abb. 3

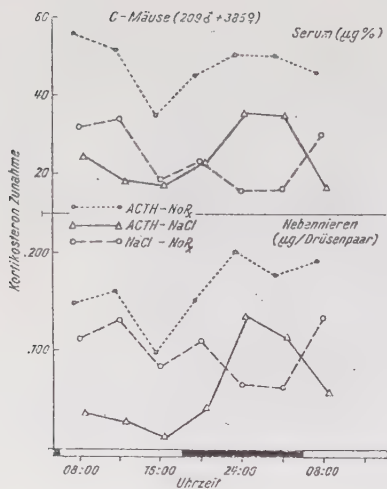
(entnommen aus Haus und Halberg, 1962)



Nebennierencorticosterongehalt in
C-Mäusen mit oder ohne vorangehender
Behandlung mit physiologischer NaCl-
Lösung oder ACTH

Abb. 4

(entnommen aus Haus und Halberg, 1962)



Corticosteronzunahme im Serum und Nebennieren nach Injektion von physiologischer NaCl -Lösung oder ACTH in verschiedenen Phasen des circadianen Adrenalzyklus.

Es konnte allgemein festgestellt werden, daß sowohl im Tierversuch bei der dunkelaktiven Maus wie auch beim tagaktiven Menschen die Maxima des Corticosteronspiegels im Serum vor dem Gipfel des circadianen Aktivitätsrhythmus liegen. Gleiche Resultate für das Maximum des Corticosterongehalts der Nebenniere konnten verständlicherweise nur beim Tier (Maus) gefunden werden.

Die Ergebnisse einzelner Untersuchungen von Forsham et al. (1955) sowie von Perkoff et al. (1959) am Menschen ließen Unterschiede in der Reaktion der Nebenniere auf ACTH, zumindest zu verschiedenen Tageszeiten, vermuten. Ob diese Unterschiede wiederum auf verschiedene Phasen des Adrenalzyklus zurückzuführen sind, wurde nicht untersucht. Beim Tier haben Haus (1961) und Haus et al. (1960, 1962) zur Beurteilung der statistischen Signifikanz solcher Unterschiede im Vergleich zu identisch behandelten Kontrollen über eine Anzahl von Versuchen berichtet.

Bagg Albino-C-Mäuse beider Geschlechter, die unter standardisierten Bedingungen in einem Licht-Dunkel-Wechsel gehalten waren, wurden in drei Gruppen aufgeteilt und die Untersuchungen im 4-h-Abstand über 24 h durchgeführt. Zu jedem Zeitpunkt wurden eine Untergruppe unmittelbar nach der Entfernung aus dem Periodikraum und 2 weitere Untergruppen 15 Minuten nach einer i.p. Kochsalzinjektion (0.2 ccm pro 20 g Körpergewicht) oder ACTH-Injektion (0.4 IE pro 0.2 ccm/20 g Körpergewicht) durch Dekapitation getötet.

Der aus den gewonnenen Nebennieren und den gesammelten Blut-Sera ermittelte Corticosteron-Gehalt ließ bei den unbehandelten Kontrolltieren einen normalen Nebennierenrhythmus erkennen (Abb. 2-4).

Die Amplitude der Corticosteron-Schwankung im Serum

war größer als die des Hormongehalts der Drüse. Der Reiz der Injektion isotonischer Kochsalzlösung alleine zeigt schon eine unterschiedliche Reaktion, bezogen auf die Injektionszeit. Es kann also unter diesen Standardbedingungen die Höhe des erhaltenen Wertes als periodische Funktion, abhängig von der Phase des Adrenal-Zyklus, in der der Reiz gesetzt wurde, angesehen werden. Aus der Abb. 4 wird die ACTH-Wirkung als Differenz zwischen den ACTH-unbehandelten und -behandelten und auch als Differenz zwischen den mit Kochsalzlösung und den mit ACTH-injizierten Tieren ersichtlich. Aus den Kurven geht weiter hervor, daß die Reaktion der Nebennierenrinde in den verschiedenen Phasen des Adrenal-Zyklus statistisch signifikante Unterschiede aufweist. Eine Phasendifferenz im Verhalten der Serum-Werte und des Nebennieren-Corticosterongehaltes ließ sich nicht feststellen.

Zusammenfassend konnte aus der Arbeit von Haus gefunden werden, daß

- 1) die Reaktion auf die Injektion physiologischer Kochsalzlösung am größten 4-8 h vor dem physiologischen Funktionsmaximum der Drüse war und am geringsten 8-12 h danach,
- 2) die Reaktion der Nebenniere auf die hohe ACTH-Dosis am geringsten zur Gipfelzeit der Corticosteroid-Rhythmen im Blut und der Drüse bei den unbehandelten Kontrolltieren, also zur Zeit des physiologischen Sekretionsmaximums der Nebennierenrinde, war.

Dieses Ergebnis erhielt man durch die Differenz zwischen den mit Kochsalzlösung und den mit ACTH behandelten Tieren. Der Reiz der Injektion wurde damit ausgeschlossen und nur die eigentliche exogene ACTH-Wirkung registriert.

Die erhöhte Reaktion der Nebenniere auf ACTH während der späten Nachtstunden in der dunkel-aktiven Maus ist vergleichbar mit der erhöhten Reaktion während des Tages beim tagaktiven Menschen.

Ebenfalls bei der C-Maus waren Ungar und Halberg (1963) der Frage nach einem circadianen Rhythmus bei der in vitro-Reaktion der Nebenniere (Maus) auf ACTH nachgegangen. Bei im Licht-Dunkel-Wechsel von 12.00 bis 18.00 standardisierten Tieren wurde eine Nebennieren-Corticosteron-Produktion gefunden, die durch ACTH in vitro stimuliert wurde und in Abhängigkeit von der Zeit stand, zu der die Nebenniere entfernt worden war. Dieser Rhythmus der Wirkung des ACTH auf die Nebenniere war nicht in Phase mit dem Corticosteron-Rhythmus im Serum der Mäuse, die als Donatoren der Nebennieren dienten. Der circadiane Nebennieren-empfindlichkeitsgipfel auf ACTH erschien somit bei ungefähr 04.00, wohingegen der circadiane größte Abfall der Empfindlichkeitskurve um 16.00 lag.

Die Feststellung einer statistisch signifikant voraussagbaren Änderung in der in vivo- und in vitro-Reaktion der Nebenniere durch Steroidproduktion auf ACTH haben weitere Bestimmungen von Dosis-Wirkungsverhältnissen anderer Substanzen in verschiedenen Stadien des circadianen Rhythmus als sinnvoll erscheinen lassen.

Halberg et al. (1959 d) untersuchten bei Mäusen die circadianrhythmische Empfindlichkeitsänderung auf toxische Dosen von Quabain, einem Herzpräparat. Die Wirkung dieses Präparats auf die Mortalitätsrate wurde als abhängig von der tagesperiodisch auftretenden "Stunde verminderter Resistenz" (Haus und Halberg, 1959; Halberg, 1960) des Körpers gezeigt.

In einer Untersuchungsreihe wurden 4-5 Monate alte D8 und C-Mäuse in sieben vergleichbare Gruppen (L: 06.00 - 18.00, D: 18.00 - 06.00) aufgeteilt und alle 4 h mit 0,5 oder 0,15 mg/20g Körpergewicht Quabain in 0,2 ccm Kochsalzlösung i.p. injiziert und die Anzahl der Todesfälle dann alle 10 Minuten post injectionem und zu verschiedenen späteren Zeiten kontrolliert. Es zeigte sich, daß die Mortalität auf Quabain im Durchschnitt um 08.00 größer war als um 20.00. Eine später durchgeführte Ergänzung hierzu zeigte (Nelson et al., 1973), daß durch Umkehr des LD-Synchronisators um 180° ebenfalls eine Verschiebung der Mortalitätsrate um den gleichen Betrag erfolgte. Auf die Bedeutung des Synchronisators wurde hinsichtlich der Phasenänderungen von circadianrhythmisch verschiedenen Funktionen von Haus und Halberg (1969) hingewiesen.

Weitere Studien der Wirkung exogener Agentien auf den Organismus der Maus, wie E.coli Endotoxin (Halberg et al., 1958, 1960), Pentobarbital (Nelson et al., 1973), Pentobarbital Natrium und Tremorin (Pauly et al., 1964; Davis, 1962), Acetylcholin (Jones et al., 1963) weisen durch unterschiedliche Mortalitätsraten bei Applikation des Präparates zu verschiedenen Circadian-System-Phasen auf einen circadianen Empfindlichkeitsrhythmus hin.

Weiter wurde in der Literatur von einem ähnlichen circadianrhythmischen Effekt der Empfindlichkeit des Mäuseorganismus auf Librium, einem neuroleptischen Präparat (Marte et al., 1961) berichtet.

Eingedenk der Tatsache, daß, wie oben beschrieben, verschiedene chemische Substanzen zu verschiedenen Circadian-System-Phasen bezogenen Zeitpunkten appliziert, verschiedene Wirkungen und Nebenwirkungen

zeigen, wurde die Frage gestellt, ob auch Cortison eine (vom Circadianrhythmus) zeitabhängige Wirkungs- und Nebenwirkungsänderung auf den Organismus der Maus und den des gesunden oder kranken Menschen hat.

A. Circadian-System-Phasen abhängige Wirkung von Cortison beim Tier (Maus)

Tarquini et al. (1966) berichteten dann von geringster Nebennierenatrophie und Corticosteroid-suppression bei Ratten, die mehrmals einmal täglich Dexamethason (ein wirkungsstarkes, synthetisches Corticosteroid) erhalten hatten, wenn die Behandlung um den Zeitpunkt des erwarteten täglichen Serumcorticosteron-Konzentrationsgipfels erfolgte. Beim Tier mit einem LD-Synchronisator von L 6.00 bis 20.00 liegt dieses Maximum um 21.00. Bei gleicher Behandlung zur Zeit vermindelter Serumhormonkonzentration resultierte eine erhebliche Nebennierenatrophie.

Retiene et al. (1967 b), die bei ihrer Untersuchung das gleiche Präparat wie Tarquini et al. verwandten, bestätigten diese Ergebnisse. Dexamethason, das gerade vor der circadianen Acrophase des Corticosteronrhythmus verabreicht wurde, hatte während den darauffolgenden 24 h keine Veränderung des Corticosteronausscheidungsrythmus der Nebenniere verursacht.

An diese Studien bei der Ratte schlossen sich, wie in dieser Arbeit ausführlich berichtet wird, Untersuchungen über die Circadian-System-Phasen bezogene Wirkungsabhängigkeit von Methylprednisolon auf die Nebenniere (Serum- und Nebennieren-corticosteron-Rhythmus), den Kalium- und Chlorid-

Ausscheidungsrythmus sowie in seiner antientzündlichen Eigenschaft auf die Granulombildung am Balsaholz (Auswertungen sind noch nicht abgeschlossen) an (Reindl et al., 1967).

Smolensky et al. (1971) haben in einer späteren Arbeit bei unreifen C-Mäusen die circadianrythmusabhängige Nebenwirkung von Methylprednisolon auf das Gewicht untersucht und dabei festgestellt, daß sowohl tägliche als auch jeden 2. Tag erfolgende Steroidbehandlung um 16.00, zu einem Zeitpunkt der erwartet höchsten Nebennierenrindentätigkeit für Tiere, die durch einen LD-Wechsel von L: 06.00 bis 18.00, D: 18.00 bis 06.00 synchronisiert sind, die geringste Verminderung der Gewichtszunahme ergeben. Zu anderen Zeiten wurde in Abhängigkeit von der jeweiligen circadianen Phase der Corticosteroidapplikation eine größere Einschränkung der Gewichtszunahme erreicht. Zu den Behandlungszeiten 04.00 oder 08.00 waren nach 20 Tagen Studiendauer Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren von 1,5 bis 1,8 g verminderter Gewichtszunahme zu verzeichnen.

B. Circadiane Periodizität beim Menschen

Circadiane periodische Schwankungen verschiedener physiologischer Funktionen waren wiederholt studiert (Aschoff, 1959; Günther et al., 1964, 1969; Halberg et al., 1964, 1966a, 1969 b, 1970; Hellbrügge et al., 1967; Hildebrandt, 1962; von Mayersbach, 1967; Menzel, 1962; Anderson, 1964; Kanabrocki, 1974) und Phasenkarten (Nelson et al., 1966; Halberg et al., 1967, 1969a) angelegt worden.

Bald wurde auch versucht, die Frage nach der Periodizität von Krankheiten und die Wirkung tageszeit-

lich unterschiedlich verabreichter Medikamente aufzuklären.

Menzel beschrieb vor über 25 Jahren "tageszeitliche Häufung bestimmter Kreislaufstörungen und das Auftreten von Asthma cardiale in den Stunden nach Mitternacht."

Er wies weiter auf ausgeprägte Tag-Nacht-Schwankungen der Vitalkapazität und Pneumometerwerte des Asthmatikers hin. Tageszeitlich unterschiedlich verzeichnete Wirkungen von Atropindosen auf die Vitalkapazität bei Asthmatikern stellten einen ersten Schritt zur Erforschung chronotherapeutischer Effekte von Medikamenten dar.

Im Zusammenhang mit dem Diabetes vermutete er nach Mitternacht die wohl größte Ansprechbarkeit des Menschen auf Insulin. Er fand außerdem bei der Cushing'schen Krankheit eine Aufhebung der Tagesrhythmik der ACTH- und Corticosteroidausscheidung mit Minimum um Mitternacht und stellte ferner das Fehlen der Tag-Nacht-Rhythmik der Eosinophilen im Blut des Addison-Kranken fest (Menzel, 1967).

C. Testung verschiedener Substanzen einschließlich Hormone auf das circadiane System beim Menschen

In einer Reihe von Untersuchungen wurden in den folgenden Jahren, wie Reinberg und Halberg (1971) in einer chronologischen Aufstellung in Tab. 1 zusammenfassen, verschiedene chemische Substanzen, darunter Dexamethason, Prednison und Cortisol in ihrer Wirkung auf den Circadian-Rhythmus des Menschen und als Funktion der Circadian-System-Phase studiert.

Diesen Arbeiten gingen 1956 und 1958 Untersuchungen von Di Raimondo et al. voraus, in denen angedeutet

Tab.Nr. 1

(entnommen aus Reinberg und Halberg, 1970)

WIRKUNG CHEMISCHER SUBSTANZEN AUF CIRCADIANRHYTHMEN BEIM
MENSCHEN UND ALS FUNKTION DER CIRCADIAN-SYSTEM-PHASE.

Gruppe	Chemische Substanz (feste Dosis, mehrere Testzeiten)	Wirkung	Ref.
Geistes- schwacher Er- wachsener	Reserpin	Änderung des Circadian- Rhythmus der Körper- temperatur	Halberg (1963)
Gesunder Er- wachsener	Cyproheptadin (per os) (Antihistaminicum)	Circadiane Änderung der Hemm- wirkungsdauer auf die Histamin- Hautreaktion	Reinberg Sidi (1966)
Gesunder Er- wachsener	Dexamethason (per os)	Änderungen des 17-OHCS- Circadianrhythmus im Plasma und Urin	Nichols et al. (1965) D'Aqata et al. (1968) Bricaire et al. (1968)
Asthma- tische Kinder	Prednison (per os)	Phasenverschiebung der Acro- phase des Circadian-Rhythmus von PEFR, K- und Cl-Ausschei- dung im Urin (keine Phasen- änderung, wenn das Medikament zur Akrophase des Plasma-17- OHCS Circadian-Rhythmus gege- ben war.	Reindl et al. (1969) Halberg (1967)
Gesunder Er- wachsener	ACTH (i.v.-Infu- sion)	Phasenverschiebung des Circadian-Rhythmus der 17- OHCS-Ausscheidung (keine Phasenänderung wenn ACTH- Infusion zum Zeitpunkt des erwarteten 17-OHCS-Ausschei- dungsgipfels erfolgte).	Martin et al. (1964, 1965)
Neben- nieren- insuffizienz	Cortisol (per os)	Phasenverschiebung der Acro- phase von Circadian-Rhythmus der Pulsfrequenz, Dynamometrie, K, N, 17-OHCS und 17 KS-Aus- scheidung im Urin	Reinberg, Ghata, Halberg Gervais, Apfelbaum et al. (nicht publiz.)
Gesunder Er- wachsener	Ethanol (per os)	Circadianänderung der Blut- Alkohol-Konzentration. Ver- änderungen von circadian- rhythmischen, psychophysiolo- gischen Tests.	Rutenfranz et al. (1967)
Diabetes- kranker Er- wachsener	Insulin	Änderung des Cortisolcirca- dian-Rhythmus im Plasma	Serio, Della Corte et al. (1970)

wurde, daß die Verabreichung von 10 mg Prednison als Einzeldosis bei einem tagaktiven Menschen, z.B. um 08.⁰⁰, im Vergleich zur geteilten Applikationsform derselben Dosis in 4 x 2,5 mg, in einer weit geringeren Nebennierensuppression resultiert.

Grant et al. bestätigten 1965 diese Erfahrung. 8 mg Triamcinolon, das 8 Tage lang um 08.⁰⁰ morgens 6 männlichen, gesunden Versuchspersonen gegeben wurde, zeigte ebenfalls keine Nebennierensuppression. Die Änderung des Serum-17-Hydroxycorticosteron-Spiegels reichte von $20,2 \pm 1,0$ ($\pm$ SE) als Ausgangsbasis bis $19,1 \pm 1,6$ $\mu\text{g}/100$ ml. Wurde dieselbe tägliche Dosis aber in 4 gleiche Teile zu je 2 mg aufgeteilt, so war die Suppression beträchtlich. Die Änderung von der Ausgangsbasis

	$21,5 \pm 1,4$	$\mu\text{g}/100$ ml
auf	$9,0 \pm 2,1$	$\mu\text{g}/100$ ml

war statistisch signifikant $P < 0,01$.

In den Arbeiten von Scalabrino und Pasquariello (1967) wurden wie bei Grant gleiche Dosen, lediglich Dexamethason, in gleicher Verteilung in ihrer Wirkung auf die Nebenniere durch 17-OHCS-Ausscheidung im Urin getestet und auch vergleichbare Ergebnisse gefunden.

Schulz und Retiene (1971) erhielten mit höheren Dosen (bis zu 50 mg) Prednison bei ähnlicher Versuchsanordnung auch ähnliche Resultate. Die Hormongabe um 08.⁰⁰ führte zu geringster Nebennierensuppression.

Nichols et al. (1965) prüften an tagaktiven, gesunden männlichen Erwachsenen eine einmalige tägliche Dosis von 0.5 mg Dexamethason um 08.⁰⁰ oder 16.⁰⁰. In beiden Fällen wurde eine leichte Verminderung der Corti-

costeron-Ausscheidung der Nebenniere gefunden. Die um 0.00 gegebene vergleichbare Dosis rief während des nachfolgenden 24-h-Zeitraumes eine völlige Unterdrückung der Corticosteronproduktion hervor.

Segre und Klaiber (1966) bestätigen und erweitern erst später diese Ergebnisse. Drei gesunde, tag-aktive, männliche Versuchspersonen erhielten über einen Zeitraum von 4 Tagen Flumethason.

Die Wirkung auf die Nebenniere wurde in getrennten Untersuchungen (08.00, 16.00 und 0.00) durch Kontrolle der 17-OHCS-Ausscheidung im Urin geprüft. Eine Hormongabe um 08.00 senkte die 17-OHCS-Konzentration um 43 %, jene um 16.00 um 61 % und die um 0.00 um 83 %. Die Berechnung wurde als statistisch signifikant bei $P < 0.01$ angegeben.

D. Untersuchungen rhythmischer Erscheinungen beim Asthmastiker und allergisch Erkrankten

An einzelnen asthmakranken Patienten hatte Menzel erstmals rhythmische Erscheinungen beobachtet und in diesem Zusammenhang die nächtliche Asthmaanfallhäufigkeit diskutiert (Menzel, 1941, 1944, 1958, 1962).

Nachdem in Vorarbeiten von Rose et al. (1955) und Roskam et al. (1956) gezeigt wurde, daß bei Patienten mit asthmavasomotorischer Rhinitis, milder Form von Urticaria und Heufieber, eine 24-h-Urinausscheidung von Nebennierensteroiden nicht nachweisbar abnorm ist, bestand weiter die Frage, ob bei Krankheiten wie Asthma, die Nebennierensekretion innerhalb der Grenzen des Normbereiches liegt.

Reinberg (1965a,b,) und Reinberg et al. (1963, 1965, 1966) führten Querschnittsgruppenuntersuchungen zur

Rhythmenanalyse beim Asthmatiker durch und wiesen dabei erstmals 1963 signifikant einen Circadian-Rhythmus in der Steroid- und Kaliumausscheidung im Urin nach.

Der Adrenalzyklus im besonderen wurde als endokrine Einheit von Halberg (1959, 1961) und Halberg et al. (1959a) und Ungar et al. (1963) beschrieben.

Reinberg wies im einzelnen bei 8 erwachsenen Asthmakranken (4 von jedem Geschlecht) und bei 4 Gesunden (2 von jedem Geschlecht) einen grob synchronisierten Circadian-Rhythmus für die Ausscheidung von 17-Hydroxycorticosteroiden, 17-Ketosteroiden und Kalium im Urin nach, wobei die 3 Verlaufskurven ihr Maximum zwischen 07.00 und 15.00, das Minimum zwischen 23.00 und 03.00 zeigten. Er schloß daraus, daß bei den Gesunden wie auch bei den Asthma-Kranken ein circadianer Adrenalzyklus bestand. Er gab dabei aber zu bedenken, "daß der Rhythmus der Kaliumausscheidung und verschiedene andere Circadian-Rhythmen, wenn auch nicht alle von ihnen, als Gruppenphänomen bei Nebenniereninsuffizienz, ob als Ergebnis eines primären Mangels der Nebenniere oder sekundär als Mangelfunktion der Hypophyse, ausgelöscht wurden". (Reinberg, 1963).

In der gleichen Arbeit fand er während den Stunden geringster Nebennierensteroid- und Kaliumausscheidung mit erstaunlicher Regelmäßigkeit das Auftreten von Asthmaanfällen.

Angesichts der Tatsache, daß Asthmakrisen bei zahlreichen Asthmatikern nur nachts auftreten, d.h. die Atemnot nachts größer als während des Tages ist, läßt es sich überlegen, ob dieses nächtliche Auftreten der Asthmakrise nicht das Resultat einer periodischen, circadianen Schwankung

der Reaktionsfähigkeit oder der Empfindlichkeit dieser Patienten ist.

Gleichwohl liegen keine Ergebnisse vor, die behaupten ließen, die Menge der spezifischen Antigene wäre nachts größer.

Um diese Überlegung weiter zu erhärten, hatten Reinberg (1965 a,b,) und Reinberg et al. (1965) an 6 erwachsenen, gesunden Patienten, die einem Tag-Nacht-Rhythmus unterworfen waren, mit Tätigkeit von 08.00 morgens bis 23.00 abends und anschließender Ruhe, die circadiane Schwankung der Histaminempfindlichkeit der Haut nachgewiesen. Dabei wurde einmal die circadiane Schwankung der Hautreaktion auf Histamin ohne jede Verabreichung von wirksamen Medikamenten dadurch geprüft, daß in 3 verschiedenen Perioden von jeweils 24 h die Erythem- und Papelgröße

- a) nach intradermaler Injektion von 10 µg Histamin sofort und 20 Min. später,
- b) nach intradermaler Injektion von 35 µg einer Substanz, 48-80 (Burroughs-Wellcome, USA) gemessen wurden.

Als weiterer Parameter wurde die 17-Hydroxycorticosteroid- und 17-Ketosteroid-Ausscheidung im 4-h-Urin festgehalten. Die 3 Funktionsgruppen ergaben circadiane Schwankungen mit statistischer Signifikanz, wobei die circadianen Komponenten der Hautreaktionen ohne nachweisbare Phasendifferenz synchronisiert waren.

In einer weiteren Ergänzung der Studie wurde nach einmaliger oraler Einnahme von 4 mg Periactinol, einem Histamin-Serotonin-Antagonisten, die Histamin-Reaktion untersucht. Für die eine Gruppe wurde das Medikament morgens um 07.00, für die andere gegen 19.00, gegeben. Bei der Einnahme von Periactinol morgens um 07.00 konnte die Antihistaminwirkung

über ungefähr 14 Stunden, bei der Einnahme um 19.00 nur während etwa 7 Stunden, beobachtet werden.

"Daraus läßt sich folgern, daß die Dauer der Antihistamwirkung dieses Präparates in einem gewissen Maße von der Zeit der Verabreichung abhängt. Es liegt nahe, daß die Wirkungsdauer eines Medikaments durchaus abhängig sein kann vom Zeitpunkt seiner Verabreichung" (Reinberg, 1965 b). Das heißt, die Wirkung des Medikaments war abhängig von einer Circadian-System-Phasen bezogenen Applikation.

Die von Reinberg et al. (1966) beobachteten verschiedenen 24-h-synchronisierten Circadianrhythmen in der Hautreaktion auf Histamin können unter dem Aspekt gesehen werden, daß es nach Halberg (1960 b,c) Stunden wechselnder Empfindlichkeit gibt. Diese Überlegung wurde schon früher von Menzel (1962) und Anderson (1961) im Hinblick auf die Reaktion des menschlichen Organismus auf Medikamente vermutet.

Da in diesen eben beschriebenen Arbeiten (Haus et al., 1969; Reinberg, 1965 a,b,; Reinberg et al., 1965, 1966) "die Veränderlichkeit der Phasenlage 24-h-synchronisierter circadianer Rhythmen nicht objektiv untersucht war", wurden quasi in einer Vorstudie zu dieser hier vorliegenden Arbeit die circadianen Phasenlagen verschiedener physiologischer Variablen bei Gruppen von gesunden Kindern und Gruppen von symptom- und behandlungsfreien asthmatischen Kindern ermittelt (Halberg und Falliers, 1966 b).

Für zwei vergleichbare Gruppen 6-15 Jahre alter männlicher Kinder, von denen sich die eine aus 19 "Asthma-Kranken in Remission" und die andere aus 17 gesunden Waisen zusammensetzte, wurden für Mund-Temperatur, Puls-Frequenz, Urinvolumen und tägliche 17-OHCS-Ausscheidung Circadianphasen-Diagramme aufgestellt.

Statistische Rechenmethoden und mathematische Verfahren
zur Periodik-Analyse, insbesondere der Cosinor-Methode.

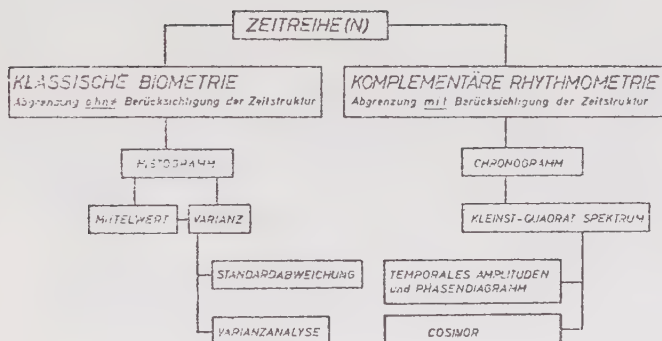
Im Laufe der Jahre wurden zur Analyse bioperiodischer Vorgänge eine große Anzahl verschiedener Rechenmethoden entwickelt, die als Autokorrelation (Kreyszig, 1967), Periodogramm (Tukey, 1961), Varianz-Analyse (Blackman und Tukey, 1958; Panowsky und Halberg, 1961; Halberg und Panowsky, 1961 b), Fourier-Analyse (Carslow, 1930) sowie Cosinor-Methode (Halberg et al., 1966a, 1973; Hellbrügge et al., 1967) bekannt sind.

Eine Folge von chronologisch geordneten Daten wird in statistischen Arbeiten allgemein als Zeitreihe bezeichnet. Die Auswertung dieser Zeitreihe beginnt durch eine makroskopische Betrachtung der Reihe und deren Darstellung, einmal als Histogramm und zum anderen als Funktion der Zeit in der Form eines Chronogramms (Halberg und Künkel, 1968).

Bei bioperiodischen Vorgängen, wie bei der Circadian-Rhythmik, genügt es nicht, die in der Zeitreihe makroskopisch erkennbaren regelmäßigen Aspekte durch konventionelle statistische Sicherungsverfahren allein auszuwerten. Es ist vielmehr unerlässlich, eine zusätzliche rhythmometrische Untersuchung anzuschließen. Besonders dann, wenn die makroskopische Untersuchung eine Periodik nicht klar erkennen läßt, muß ein mikroskopisches (Blackman und Tukey, 1958; Halberg et al., 1961 b, 1964, 1965, 1966a, 1967 b; Helmchen et al., 1964; Mercer, 1960; Panowsky und Halberg, 1961) Vorgehen zur Aufdeckung eines Rhythmus gewählt werden. Dies ist auf dem Weg der in der Tabelle (Tab. 2/rechts) gezeigten Weise möglich.

Im Vergleich zum Varianz-Spektrum (Mercer, 1960; Blackman und Tukey, 1958) werden durch das Kleinst-Quadrat-Spektrum (Engeli und Halberg, 1964) signifikante Fre-

Tab. Nr. 2



(entnommen aus Günther et al., 1964)

quenzen in einer Zeitreihe, besonders bei ungleichen Intervallen gefunden und zum anderen jede Frequenz wie auch Amplitude und Phase quantitativ dargestellt. Da das Kleinst-Quadrat-Spektrum sowohl Amplitude als auch Phase einer jeden Komponente darstellt, erbringt es eine Information, die in dem herkömmlichen Varianz-Spektrum ganz verloren geht und nur teilweise im Kreuz-Spektrum (Halberg et al., 1964) entdeckt wird.

Die in dieser Arbeit bei den verschiedenen Untersuchungen gesammelten Daten wurden durch eine Dreiweg-Analyse der Varianz auf den Ursprung der Variation hin untersucht. Die statistische Methode nach Tukey (1961) wurde verwandt, um Unterschiede zwischen den Faktoren-Mittelwerten aufzufinden.

Das einfachste Charakteristikum der Zeitreihe ist der Mittelwert, angegeben durch $\bar{x}$, danach die Varianz σ^2 , gemessen als Variabilität des individuellen Wertes in Bezug zum Mittelwert. Die Varianz σ^2 kann berechnet werden durch Subtrahieren des Mittelwertes von jedem individuellen Einzelwert, z.B. der Temperatur, durch Quadrieren der erhaltenen Differenzen und Darstellung des Mittelwertes aus dieser Reihe. Die Quadratwurzel aus der Varianz $\sqrt{\sigma^2}$ ist die Standardabweichung SD (Halberg und Panowsky, 1961 b).

Die bei der Untersuchung der Zeitreihen zum inferenzstatistischen Nachweis eines Circadian-Rhythmus wie auch zur quantitativen Auswertung der Reaktion auf zeitlich verabfolgte Medikationen, durch Ermittlung des Rhythmusparameter-Niveau C_0 , Amplitude C und Acrophase φ , angewandten Cosinor-Methode soll im folgenden in einzelnen Schritten dargestellt werden.

Die Methode baut sich auf drei Schritten auf, die mit elektronischen Rechnern durchgeführt werden. Als Testkriterium des Cosinor gilt die statistische Verteilung der Phasen, die im Falle gewisser Rhythmen mit verhältnismäßig fixer Frequenz und Phasenlage nicht zufallsbedingt ist (Halberg et al., 1966 a).

Die ersten beiden Schritte der Cosinor-Methode werden automatisch durch ein elektronisches Computer-Programm ausgeführt, wohingegen der dritte Schritt in der graphischen Darstellung der Ergebnisse besteht.

Beim ersten Cosinor-Schritt werden der Zeitreihe einer Probe nach der Gauß'schen Methode der kleinsten Quadrate Funktionen angepaßt, die äquivalent sind zu der Funktion:

$$y = C_0 + C \cos (\omega t + \varphi),$$

wobei C_0 das Niveau, C die Amplitude, t die Zeit, φ die Phase und ω die Kreisfrequenz sind.

In Fällen, wie hier in dieser Arbeit, bei denen der Cosinor zur Ermittlung eines möglichen, 24-Stunden synchronisierten Rhythmus angewandt wird, beträgt die angepaßte Kreisfrequenz einen Zyklus pro 24 Stunden.

$$\omega = 2 \pi f,$$

wobei $f = \frac{1}{\tau}$; $\tau = 24 \text{ h}$, sind.

Die Kenngröße C_0 = Niveau wird mit dem Mittel- von Originalwerten $\bar{x}$ verglichen, um zu zeigen, daß C_0

und $\bar{x}$ bei, zu ungleichen Intervallen verfügbaren Daten auch verschieden sein können. Dies geht aus der Kurve (Abb. 5) deutlich hervor (Halberg und Künkel, 1968).

In einem zweiten Schritt werden durch ein elektronisches Rechenverfahren aus den im ersten Schritt erhaltenen Wertepaaren C' und φ' der Rhythmik der individuellen Serie, die Amplitude und Phase, $C + \varphi$ der Probe als Ganzes berechnet. Zu jedem dieser Werte wiederum wird der korrespondierende Konfidenzbereich bestimmt.

Die Werte C' und φ' können durch einen Vektor (C' und φ') summiert werden. Wie in dem nachfolgenden Rechengang ersichtlich wird, schließt sich dem Schritt der Vektoren-ermittlung C' und φ' ein weiterer an, der die Vektorsumme (C und φ) der einzelnen individuellen Vektoren C' und φ' erbringt.

Wenn man aus der verfügbaren Zeitreihe durch die Gauß'sche Methode der Anpassung kleinster Quadrate nach der Funktion

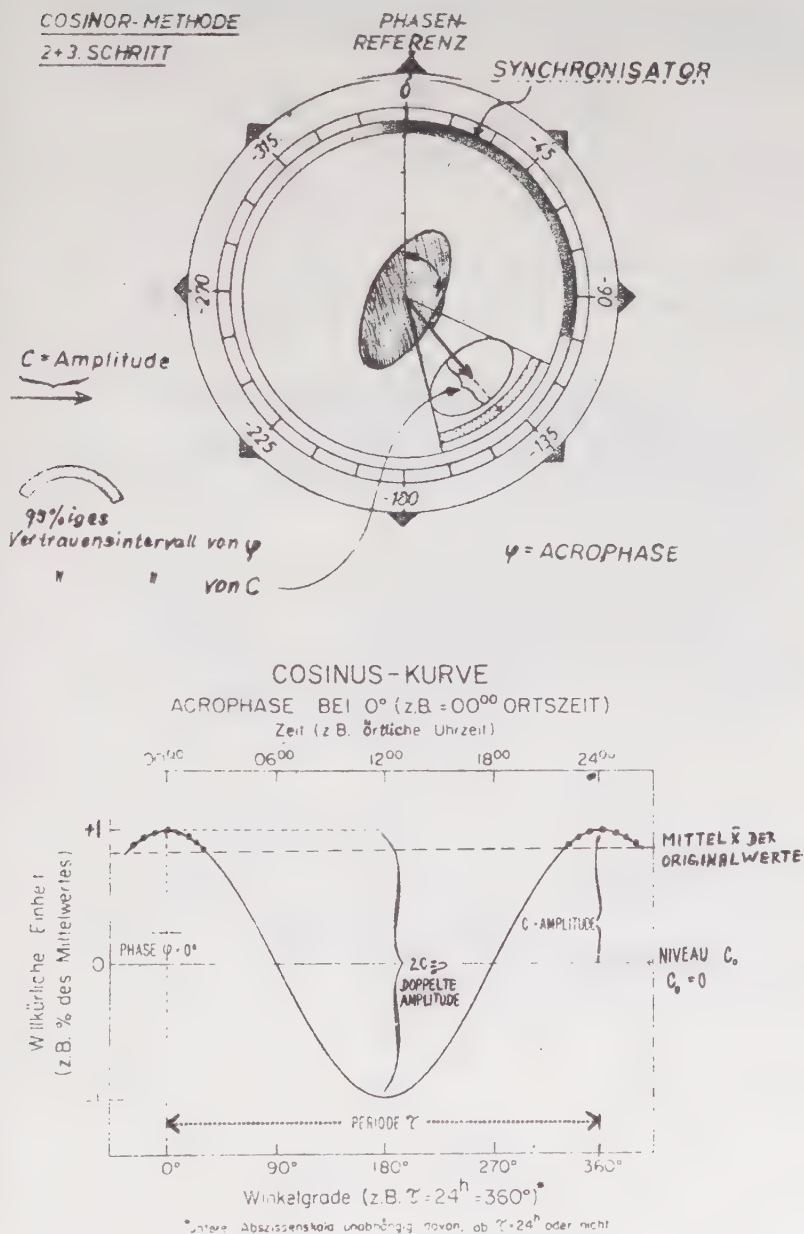
$$y = C_0 + C \cos (\omega t + \varphi)$$

die Sin.- und Cos.-Werte, y_1 und x_1 , des entsprechenden Phasenwertes φ' erhalten hat, so werden diese mit dem dazugehörigen Amplitudenwert C' multipliziert. Die dabei ermittelten Produkte werden als y_1' und x_1' bezeichnet und stellen "amplitudenbeschwerte" Sinus- und Cosinus-Werte dar.

$$\begin{aligned} y_1 &= \sin \varphi' \\ x_1 &= \cos \varphi' \\ \hline y_1' &= C_1' \cdot y_1 \\ x_1' &= C_1' \cdot x_1 \end{aligned}$$

Abb. 5

(teilweise entnommen aus Günther et al., 1969)



Aus der Summe der einzelnen y'_i -Werte ($\sum y'_i$) und der Summe der x'_i -Werte ($\sum x'_i$) errechnen sich nach der Formel:

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y'_i}{n} \quad \text{und} \quad \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x'_i}{n}$$

die Vektorsummenmittel $\bar{y}$ und $\bar{x}$,
wobei $x'_i = c'_i \cdot \cos \varphi'_i$ und $y'_i = c'_i \sin \varphi'_i$ sind.

In einem rechtwinkligen Koordinatensystem wird das Vektorsummenmittel, wie aus der Abb. 6 durch Pfeile ersichtlich ist, durch das Wertepaar $\bar{x}$ und $\bar{y}$ dargestellt.

In einem Polarkoordinatensystem (Abb. 7) wird das Vektorsummenmittel durch das Wertepaar C und φ bestimmt, wobei sich die Länge des mittleren Vektors oder der mittleren Amplitude C nach der Formel:

$$C = \sqrt{\bar{x}^2 + \bar{y}^2}$$

und die Richtung des mittleren Vektors oder die mittlere Phase φ nach

$$\bar{y} = C \sin \varphi; \quad \bar{x} = C \cos \varphi$$

berechnen.

Abb. 6

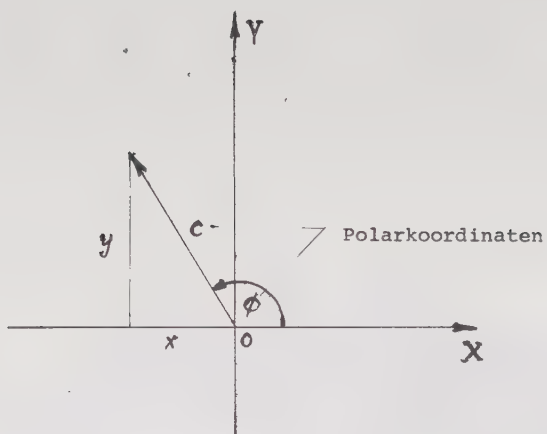
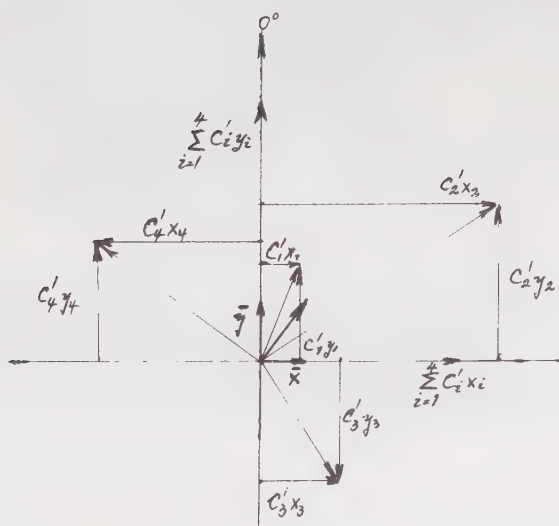


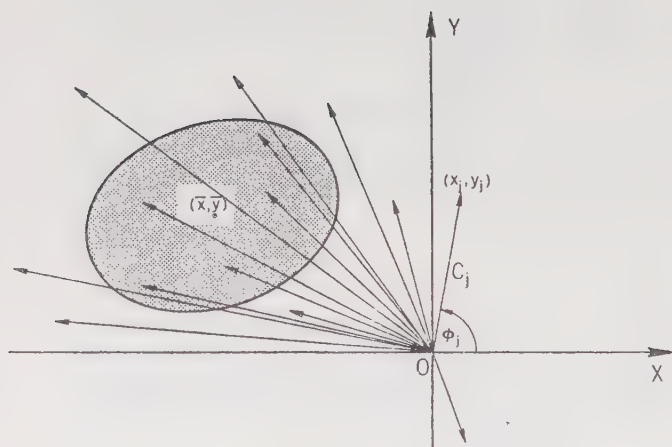
Abb. 7



Vektor-Summendiagramm

Abb. 8

(entnommen aus Batschelet, 1965)

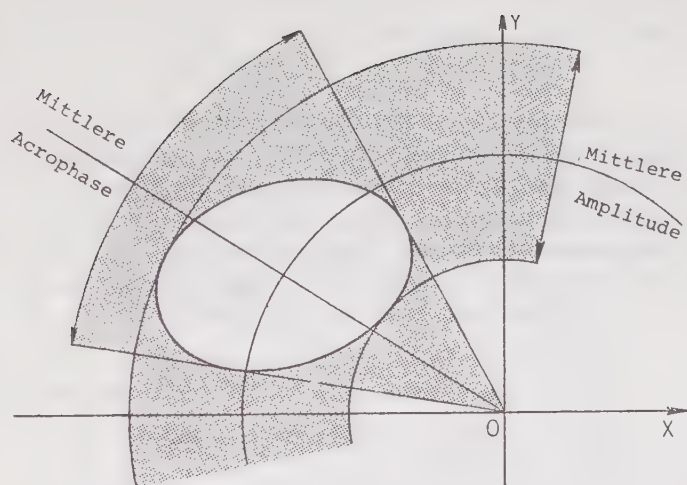


C o s i n o r - V e r f a h r e n

Ein Beispiel für Acrophasen mit ihren dazugehörigen Amplituden. Der Mittelwert des zweidimensional gestreuten Diagramms ist der Punkt $(\bar{X}, \bar{Y})$. Eine Vertrauens-Ellipse für den theoretischen Mittelpunkt (M_x, M_y) ist ebenfalls dargestellt.

Abb. 9

(entnommen aus Batschelet, 1965)



COSINOR-VERFAHREN

Vertrauensbögen für mittlere Amplituden- und Acrophasenwerte

Beim dritten und letzten Schritt der Cosinor-Methode wird durch ein elektronisches Verfahren das "Vektorsummenmittel als der Schwerpunkt der Endpunkte aller Vektoren" (Halberg et al., 1966a) und nach Wahl der Vertrauensgrenze von 95 % (das Programm liefert jedoch alle Berechnungen für eine Reihe von Vertrauenskoeffizienten: 0,7; 0,8; 0,9; 0,95; 0,975; 0,99 und 0,995) der Vertrauensbereich in Form einer Fehlerellipse mit dem Vertrauensintervall der Phase (=Vertrauensbogen genannt) und dem Vertrauensintervall der Amplitude, graphisch dargestellt. (Abb. 8 und Abb. 9).

Abb. 5 demonstriert 2 Fehlerellipsen, von denen die eine den Pol der Darstellung überlagert und damit aussagt, daß durch die Cosinor-Methode ein Rhythmus nicht nachgewiesen werden konnte, die andere den Pol nicht überlagert und somit eine Rhythmik angibt. In diesem letzteren Fall allein kann über die Amplitude C und die Acrophase φ ausgesagt werden.

Um die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Werte für C und φ richtig beurteilen zu können, muß man sich darüber klar sein, daß sie als Werte einer biologischen Zeitreihe zu keinem, im statistischen Sinn, idealen Bevölkerungsparameter C und φ einer Rhythmik in Beziehung gesetzt werden können, da es diese verständlicherweise nicht gibt. Gleichwohl darf man für den "idealen" Parameter C annehmen, daß er $C \geq 0$ ist und daß φ zwischen 0° und 360° liegt, wenn man eine Gradskala von nur 360° zugrunde legt. Außerdem muß dabei angenommen werden, daß es sich um eine Rhythmik mit der Periode handelt, für die ein Wert als Funktion der Zeit, $f(t)$ zumindest als Annäherung gleich $f(t + \tau)$ ist. (111)

Da es einen statistisch idealen Bevölkerungsparameter zu erheben nicht gibt, besteht lediglich die Möglichkeit einer Stichprobe, durch die Schlüsse auf eine Grundgesamtheit gezogen werden können. Man darf annehmen, ein spezifizierbarer Wahrscheinlichkeitsraum liegt einer zufälligen Verteilung von Proben zugrunde.

Nehmen wir für einen der in dieser Arbeit behandelten Fälle an, daß für x und y , die sich aus $x = C' \cos \varphi'$ und $y = C' \sin \varphi'$ berechnen, eine zweidimensionale (bivariate) Normalverteilung vorliegt.

x und y stellen in der Statistik ein Schätzwertepaar für das C und φ der Grundgesamtheit dar.

Nimmt man den ganzen Raum, der von allen Schätzwertepaaren x_n und y_n belegt ist, so ist in diesem Probenraum das Schätzwertepaar C und φ der Grundgesamtheit nur ein einzelner Punkt. Ein Schätzwertepaar einer zweiten, noch so ähnlichen Probe wird von dem der ersten verschieden sein.

Es läßt sich daraus ersehen, daß zur Berechnung von Vertrauensgrenzen für die unbekannten Parameter C und φ die Konstruktion eines Bereichs bleibt, in dem die wahren Parameter C und φ mit einer gewählten Wahrscheinlichkeit $1 - \alpha$ enthalten sind. $1 - \alpha$ bezeichnet man den Vertrauenskoeffizient und α das statistische Signifikanzniveau. Um Schlüsse mit einem statistischen Signifikanzniveau von 5% zu ziehen, berechnet man also Vertrauensgrenzen mit einem (Vertrauens-) Koeffizienten von 0,95. Dies besagt wiederum, daß bei Wiederholung vieler Proben gleicher Größe und Art 95 % der so erhaltenen "sehr vielen" Vertrauensbereiche die Lage der wahren Grundgesamtheitsparameter enthalten würden.

Von den durch die Cosinor-Methode erhaltenen Parameter C_0 , C und φ , bedarf die Phasenlage φ einer näheren

Betrachtung. Die im Einheitskreis von 360° dargestellte Acrophase φ wird nur dann zur lokalen Uhrzeit in Beziehung gesetzt werden können, wenn der Synchronisator der einzelnen Versuchspersonen oder -tiere, der Belichtungswechsel und die damit verbundene Lebensweise bekannt sind. Dies ist z. B. der Fall, wenn gleichzeitig eine Phasenangabe vorliegt, deren Wert den Synchronisator schon berücksichtigt. Es wird dies dadurch erreicht, daß statt lokaler Mitternacht etwa die Mitte der, der Lebensweise der Versuchsperson entsprechenden täglichen Dunkelheitsspanne gewählt wird.

Solch eine Phasenangabe ist in Graden ausgedrückt und trägt als Zeichen der Verzögerung des durchschnittlichen Gipfels der Rhythmik φ , bezogen auf den als Phasenreferenz gewählten Mittelpunkt der täglichen Dunkelheitsperiode, ein Minuszeichen.

Weitere in dieser Arbeit angewandte einfache statistische Rechenmethoden.

- 1) Der Mittelwert aus einer Zahl von Punkten errechnet sich aus der Summe aller Punkte, dividiert durch ihre Anzahl:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

- 2) Die Standardabweichung der Meßpunkte $x_1, x_2, \dots, x_n$, wird als Wurzel der Summe der mittleren quadratischen Abweichungen jedes einzelnen Meßwertes vom Mittelwert definiert:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

i.e., Die Quadratwurzel aus der Varianzschätzung ist die Standardabweichung SD.

Die Standardabweichung des Mittelwertes, SE, ist wie folgt zu berechnen:

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{N}}$$

Als eine Methode der statistischen Signifikanzberechnung wurde die F-Verteilung oder auch Fisher-Test gewählt (Fisher, 1924; Documenta Geigy, 1969).

Es seien s_1^2 und s_2^2 zwei stochastisch unabhängige Schätzungen von σ^2 aus derselben, normalverteilten Grundgesamtheit mit Varianz σ^2 . Dann ist nach:

$$\chi^2_\nu = \frac{\nu s_\nu^2}{\sigma^2}$$

wobei ν = Freiheitsgrad von s^2 ist.

$$s_1 = \sigma^2 \frac{\chi^2_1}{\nu_1} \quad \text{und} \quad s_2 = \sigma^2 \frac{\chi^2_2}{\nu_2}$$

Für den Freiheitsgrad F ergibt sich der Quotient:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{\chi^2_1/\nu_1}{\chi^2_2/\nu_2} ; \quad 0 \leq F < \infty$$

Die F-Verteilung ist eine stetige unsymmetrische Verteilung mit einem Variationsbereich von Null bis Unendlich.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A) Klinische Beobachtungen

1. Material und Methodik

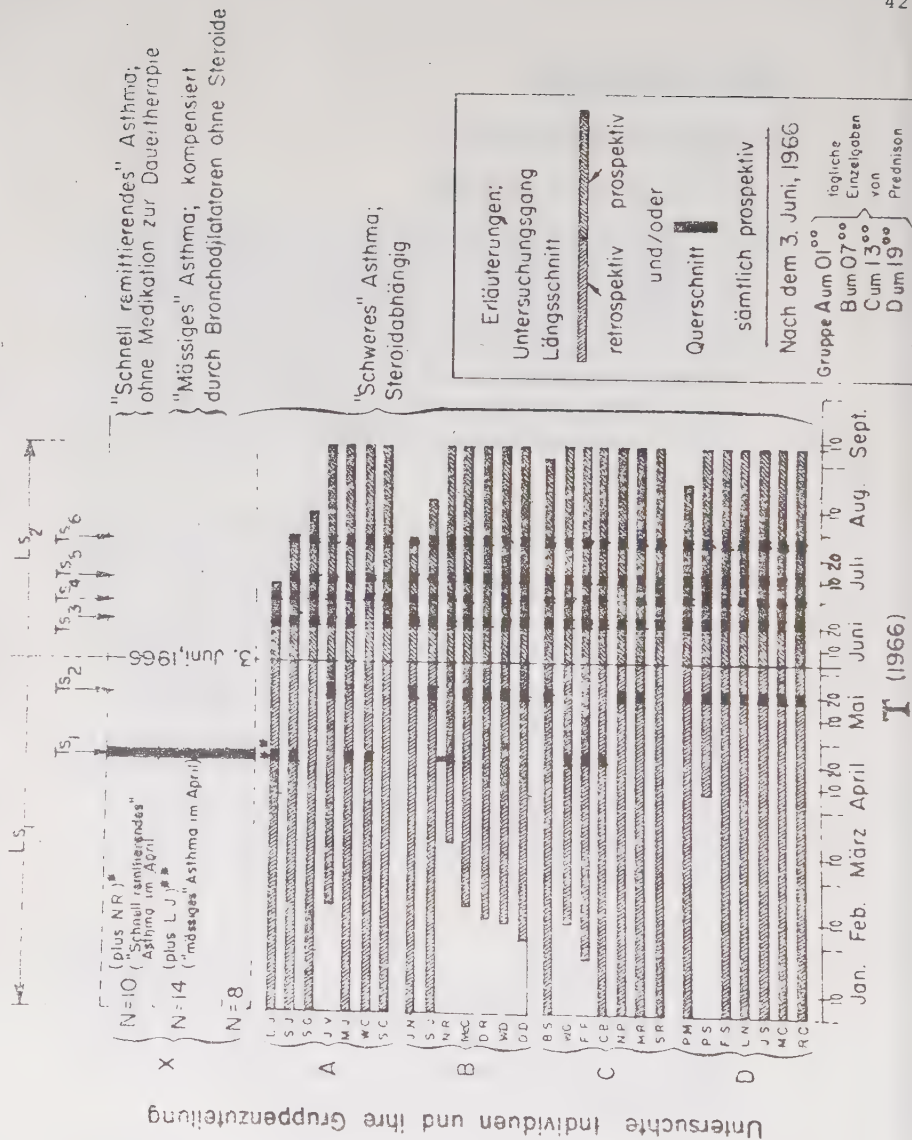
Die 1966 im Children's Asthma Research Institute and Hospital in Denver, Colorado/USA, durchgeführte klinische Studie bei asthmatischen Kindern zur Erforschung circadianer Rhythmik verschiedener physiologischer Funktionen sowie der Phasenänderung des Rhythmus durch zu verschiedenen Circadian-System-Phasen bezogenen Cortisonapplikation zerfiel in zwei Gruppen.

Die Studie wurde aufgeteilt in eine Längs- und mehrere Querschnitts-Untersuchungen, wobei von letzteren die erste Querschnitts-Studie dazu diente, einmal die circadiane Rhythmizität verschiedener untersuchter physiologischer Funktionen zu demonstrieren und im Sinne einer Vorstudie den prinzipiellen Ausschluß einer circadianen Desynchronisation des Atemstoßes (Murray and Cook, 1963; Wright et al., 1959; Wyss, 1967) -PEFR, ein Maß für Luftwegsverengung, mit Hilfe dessen der therapeutische Erfolg gemessen werden kann - nachzuweisen und damit die Voraussetzung für die sich anschließende Cortisonstudie zu liefern.

In der Asthma-Klinik in Denver werden ständig etwa 165 Kinder mit einer durchschnittlichen Aufenthaltsdauer von 18-24 Monaten stationär behandelt. Nach Falliers et al. (1959) werden diese Patienten entsprechend dem Schweregrad ihrer Asthmaerkrankung in drei Gruppen eingeteilt (Reindl, 1967).

Zur ersten Gruppe, den "Rapid Remitters", werden Kinder gezählt, die gewöhnlich schon bald nach der

Minimierter Untersuchungsang im Zeitablauf (Abszisse) bei einzelnen Versuchspersonen (Ordinate) zur kombinierten Quer- & Längsschnitt Datenauswertung



stationären Aufnahme unter entsprechender Medikation die asthmatischen Symptome verlieren. Meist kann die medikamentöse Behandlung bald völlig eingestellt werden, ohne daß schwerere oder leichtere asthmatische Erkrankungen wieder auftreten.

Die zweite Gruppe, die "Mild Asthmatics", bezeichnet Kinder mit leichtem Asthma. Sie haben häufig Asthmaanfälle -gewöhnlich mehrere Male im Monat-, die im Regelfall durch Bronchodilatoren ohne Steroide beherrscht werden. Eine Untergruppe dieser Asthmaform hat stärkere Anfälle und bedarf zuweilen einer Cortisontherapie. Sie dauert niemals länger als die Hälfte der Behandlungszeit.

Zur dritten Gruppe, den "Severe Asthmatics", werden Kinder mit schwerem Asthma gerechnet, die Steroide fast ohne Ausnahme schon viele Monate hindurch -manche sogar jahrelang vor Aufnahme in die Klinik- erhalten haben. Eine Reduktion der täglichen Steroiddosis unter die kritische Erhaltungsdosis führt regelmäßig zu schweren Asthma-Anfällen und oft zum Status asthmaticus. Dieser kann dann nicht anders als durch hohe Dosen von Steroiden beherrscht werden.

Die Versuchspersonen, wie in Abb. 10 beschrieben, erlebten einen klinischen Routine-Ablauf täglicher Aktivität und nächtlicher Ruhe von 21.00 bis 07.⁰⁰ (Halberg und Falliers, 1966 b; Reindl, 1967).

Der Tagesgang der Kinder war wie folgt geregelt: Aufstehen 07.⁰⁰, Frühstück 08.⁰⁰, Schulzeit 8.⁴⁵ bis 15.³⁰, Mittagessen 12.⁰⁰, Abendessen 17.⁰⁰, Zubettgehen je nach Alter zwischen 20.³⁰ und 22.⁰⁰ Uhr.

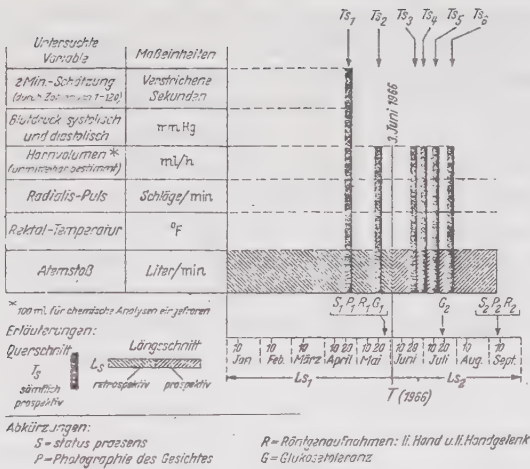
Die der Hauptuntersuchung mit Längs- und Querschnitts-Studien vorausgegangene erste Querschnitts-Studie (Ts_1) umfaßte 40 Kinder und wurde unterteilt in drei Untergruppen:

1. Gruppe: 11 Kinder mit abgeklungenem Asthma.
2. Gruppe: 15 Kinder mit mäßigem Asthma ohne Steroidmedikation.
Die einen Monat vor der Studie in dieser Gruppe errechnete unterschiedliche Asthmanfallshäufigkeit läßt drei weitere Untergruppen einteilen.
3. Gruppe: 14 Kinder mit schwerem Asthma und Steroidtherapie, die sich durch täglich erforderliche Mengen an Steroiden in vier Untergruppen aufteilte.

Wie aus Abb. 10 ersichtlich ist, wurde bei denjenigen Kindern, die in die Längsschnitt-Studie aufgenommen wurden, in die erste Querschnitts-Studie Ts_1 aber noch nicht einbezogen waren, einen Monat später eine Ergänzungsuntersuchung durchgeführt.

Die in der ersten Querschnitts-Studie Ts_1 , alle 4 Stunden über einen Zeitraum von insgesamt 48 Stunden, gemessenen Funktionen können der Abb. 11 entnommen werden. Die Zweiminutenzeitschätzung, ein Maß

Abb. 11



Physiologische Funktionen bei asthmatischen Kindern und zeitliche Anordnung der Quer- und Längsschnittuntersuchungen
 (Januar bis September 1966)

unterschiedlicher Konzentrationsfähigkeit, wurde durch Zählen von 1-120 ausgeführt und die dabei verstrichene Zeit in Sekunden durch eine Stoppuhr festgehalten (Reindl, 1967).

Die Blutdruckwerte wurden im gleichen Zeitabstand, systolischer und diastolischer Wert, in mmHG gemessen und das Harnvolumen jeweils alle 4 Stunden zum Zeitpunkt der Untersuchung bestimmt und in ml pro Stunde angegeben. 100 ml wurden jeweils für chemische Analysen eingefroren. Radialis-Puls wurde als Schläge/Min. festgehalten und die Rektaltemperatur zunächst in Grad Fahrenheit ($^{\circ}\text{F}$) angegeben und später in Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) umgerechnet.

Der Atemstoßwert (PEFR) wurde mit einem Wright-Instrument (Murray und Cook, 1963; Wright et al., 1959) sowohl in dieser Studie T_{s_1} als auch während einer Längsschnitt-Studie, die einen Zeitraum von Jan. bis Sept. 1966 umgrenzte, sowie in verschiedenen später zusätzlich durchgeführten Querschnitts-Studien gemessen.

Während alle Querschnitts-Studien in prospektiver Weise durchgeführt wurden, wurden die Atemstoßwerte bis zum 3. Juni 1966 in retrospektiver Weise ausgewertet. An diesem Tag nämlich hatte, wie auf der Ordinate in Abb. 10 ersichtlich, eine prospektive Untersuchung an vier Gruppen von Kindern A, B, C und D, begonnen. Die für die Studie ausgewählten 28 Kinder, die in 4 gleiche Gruppen mit je 7 Kindern aufgeteilt wurden, litten an schwerem steroidabhängigem Asthma. Bis zum 3. Juni wurden sie meistens durch Einzeldosen von Cortison, am Morgen um 08.00 (± 10 Min.) verabreicht, behandelt.

Aus einem Kollektiv von 165 Kindern wurden für diese 4 Gruppen Patienten ausgewählt, die, soweit als möglich, gruppengleich waren durch Geschlecht, Alter, Größe, körperliche Entwicklung (gemessen an ihrem Skelettalter nach Greulich und Pyle, 1964), ihrer geistig-seelischen Reife und der Schwere ihres Asthmaleidens, beurteilt durch das Verhältnis des tatsächlichen PEFR zum altersentsprechend bestimmten PEFR-Normalwert (zum Vergleich dienten die von Murrey and Cook, 1963, erarbeiteten "Normalwerte") und durch die klinisch bestimmte Erfordernismenge an Cortison.

Anthropometrische, physiologische, therapeutische Daten sowie Untersuchungen über Verhaltensweisen einzelner für die Studie ausgewählter Kinder waren Kriterien für die Gruppenanpassung.

Mit dem Beginn der Studie am 3. Juni 1966 erhielt jedes Kind, das in Abb. 10 durch eine von links nach rechts laufende schraffierte Säule dargestellt wird, Prednison zu einer bestimmten Uhrzeit unter bestimmten standardisierten Bedingungen. Die Gruppe A erhielt das Prednison täglich um 01.00, Gruppe B jeden Morgen um 07.00, Gruppe C um 13.00 und Gruppe D um 19.00, für einen Zeitraum, der in der Abb. 10 durch die Länge der quer-verlaufenden Säulen angegeben ist. Im einzelnen war dies nach dem 3. Juni 1966 für länger als 1 Monat, in den meisten Fällen für mehr als 3 Monate, danach gegeben. An anderer Stelle wird später darauf hingewiesen, daß die Tatsache des Vorhandenseins eines 24-Stunden-synchronisierten Circadian-Rhythmus des Atemstoßwertes PEFR der einzelnen in der Studie untersuchten Kinder, nachgewiesen durch ein Kleinst-Quadrat-Spektrum, die Wahl einer fixierten täglichen Behandlungsuhrzeit rechtfertigt.

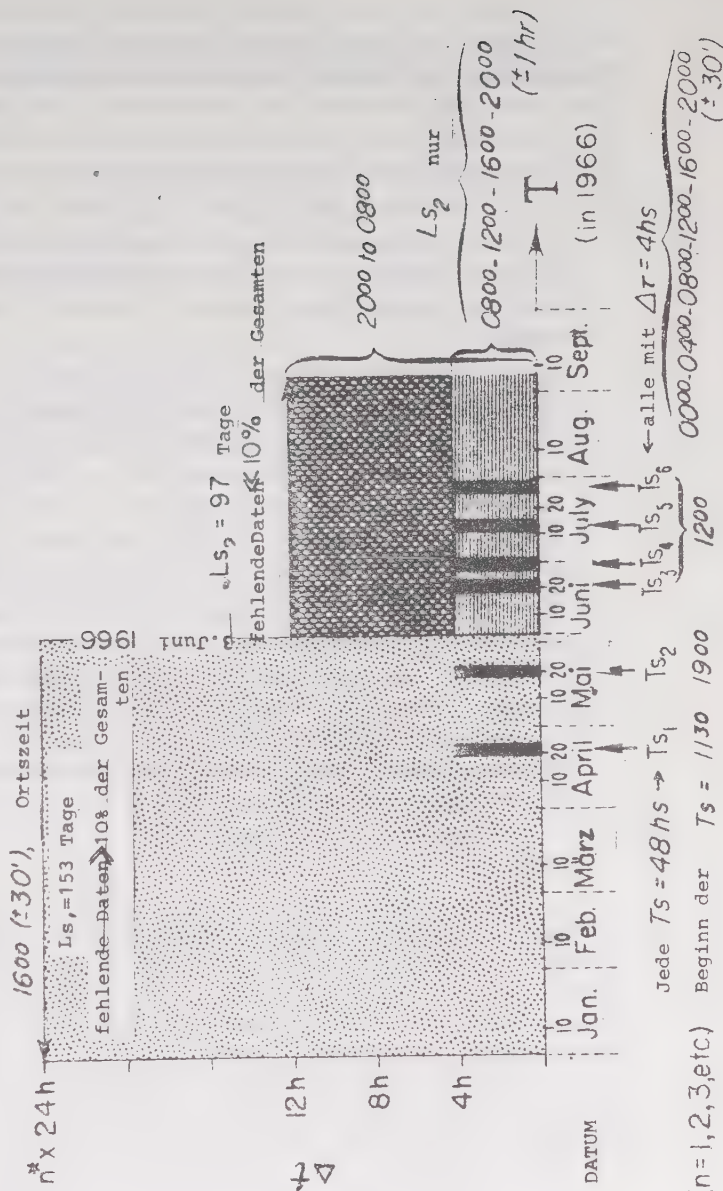
Die schraffierten querliegenden Säulen begrenzen den Zeitraum, in dem PEFR mehrmals am Tag gemessen wurde, und damit der Zustand der Synchronisation des circadianen respiratorischen Untersystems überprüft und, wie früher erwähnt, der Zustand des Asthma dadurch gemessen wurde, nachdem PEFR als ein Maß für Luftwegsverengung gilt. Im Gegensatz zur Querschnitts-Studie 1 wurden in der Ergänzungstransversal-Studie Ts₂ und den während der Cortison-Zeit-Therapie-Studie Ts₃ bis Ts₆ durchgeführten Transversaluntersuchungen, wie auf Abb. 11 durch Pfeile angezeigt ist, Urin, Radialpuls, Rektaltemperatur und PEFR im 4-Stunden-Intervall über 48 Stunden aufgezeichnet.

Die Abb. 12 stellt das Zeitschema dar, nach dem die einzelnen Daten gesammelt und besonders die Querschnitt- und Längsschnittaufzeichnungen des Atemstoßwertes (PEFR) durchgeführt wurden. In der Zeit von Anfang Januar bis zum 3. Juni 1966 waren PEFR über 153 Tage einmal täglich um 16.00 ($\pm$ 30 Min.) Ortszeit festgehalten worden, wohingegen der gleiche Parameter vom 3. Juni an bis Anfang September = 97 Tage im Vergleich zur vorgenannten Periode, mit der Ausnahme von Ts₁ und Ts₂ im April und Mai, im Sinne einer Hybridprobe, nämlich sowohl im Längsschnitt als auch mehrmals im Querschnitt (Ts₃ bis Ts₆) festgehalten wurde.

In der Hälfte vom 3. Juni bis Anfang September erfolgten PEFR-Messungen um 8.00, 12.00, 16.00 und 20.00 Uhr ($\pm$ 1 h) zusätzlich alle 4 Stunden ($\pm$ 30 Min.) an den Zeitpunkten der Querschnittsuntersuchungen Ts₃ bis Ts₆.

Bei der oben erwähnten Hybridprobe handelt es sich im Gegensatz zu der in der Literatur angegebenen Oregoner-Hybridprobe (Halberg et al., 1966a) nur insofern um ein Hybridverfahren, als zur Auswertung Meßdaten, ermittelt aus einer Längsschnitt- und mehreren Querschnittsreihen, zur Verfügung standen.

SCHEMA DER LÄNGS- UND QUERSCHNITTSTUDIE.

Intervalle zwischen Datenaufzeichnung (Δt) und Uhrzeit der Untersuchung.

Die bei der Planung der klinischen Studie angestellten Überlegungen im Hinblick auf die für eine Rhythmenanalyse notwendige Zeitdauer der Untersuchung wie auch erforderlichen Anzahl von Einzelmessungen und Anzahl von Versuchspersonen sollen hier zusammengefaßt werden.

1. Die erste Forderung an die gesammelten Einzeldaten, die als Funktion der Zeit gegeben sein müssen, um sich zur Analyse einer Rhythmik zu eignen, wurde erfüllt.
2. Ganz allgemein gilt, wenn die untersuchten zeitlichen Veränderungen nicht ideal regelmäßig sind und man die physiologischen Daten einer sog. harmonischen Analyse zu unterwerfen hat, um die Rhythmen zu demonstrieren und deren Parameter statistisch auszuwerten, daß einige durch das Auflösungsvermögen der benützten Analyseverfahren gestellte Bedingungen erfüllt werden:
 - a) die Zahl der Beobachtungen soll entsprechend groß sein,
 - b) der Intervall zwischen den Beobachtungen Δt entsprechend klein, und
 - c) die mit Daten belegte Zeitspanne T im Verhältnis zu der zu untersuchenden Periode der Rhythmik genügend lang sein (Halberg, 1953).

Die Cosinor-Methodik zur Untersuchung der sog. longitudinalen Proben (etwa $T > 30 \tau$, wobei $\tau = 24 \text{ h}$ ist) wird einmal dafür, aber ebenfalls zur Analyse sog. Transversalproben oder -profile angewandt, die aus n -kurzen (etwa $T \ll \tau$) Zeitreihen bestehen.

Für die Untersuchung der Rhythmik anhand einer Transversalprobe ist wünschenswert, daß die Varianz zwischen den Subjekten entweder gleich null gesetzt wird, indem man vor der Cosinor-Analyse jeden Originalwert als Prozent

des Mittelwertes der Serie ausdrückt oder sich so verhält, daß sie zum Zweck der Rhythmenanalyse vernachlässigt werden kann (Halberg, 1953; Halberg et al., 1966a).

Bei der in der Literatur beschriebenen Oregoner Hybrid-Probe handelt es sich um einen Kompromiß zwischen Längsschnitt- und Querschnitt-Probe, bei der $2\tau < T \leq 30\tau$ sind.

Eine Hybrid-Probe wird dann sinnvoll angewandt werden, wenn die durch statistische Kriterien erforderliche Zahl n von, durch Daten belegten τ'_s , weder durch ein Längsschnitt- noch durch ein Querschnitts-Profil erhältlich ist.

Die in dieser Arbeit angesetzten Zeitreihen wurden nicht nur auf Nachweis einer Circadian-Rhythmik hin untersucht, sondern auf die Frage hin analysiert, ob eine circadianphasenbezogene Steroidmedikation eine Phasenverschiebung oder Desynchronisation einzelner Parameter ergibt. Um dies beantworten zu können, wurden 4 Querschnitts-Studien angesetzt und der retrospektiven Datenanalyse einer Längsschnitt-Reihe über 3 Monate und einer prospektiven Longitudinal-Studie vom Juni bis September gegenübergestellt.

Der für die einzelnen Untersuchungen gewählte Zeitplan kann der Abb. 12 entnommen werden. Wie ersichtlich ist, wurden im prospektiven Teil der Studie eine Anzahl von Körperfunktionen im Intervall von jeweils 4 Stunden während der Wachperiode -der Nachtschlaf blieb ungestört- aufgezeichnet. Zusätzlich zu den in Abb. 11 auf der Abszisse aufgeführten Parametern wurden zur Erfassung der Nebenwirkungen der Cortison-Therapie auch am Beginn und Ende der Längsschnitt-Reihe bei jedem Kind einige spezi-

elle Untersuchungen vorgenommen; eine Photographie des Gesichts vor und nach der Studie, um die Ausbildung eines Cushing-Gesichts (Mondgesicht) zu erfassen; Glukosetoleranztests, die negativ verliefen, Röntgenaufnahmen der linken Hand und des Handgelenks. Bei allen Kindern wurde außerdem eine übliche Körperganzuntersuchung durchgeführt, um mögliche Nebenwirkungen im Verlauf der Studie zu erfassen. Auf der Zeitskala in der Abb. 11 sind diese punktuellen Untersuchungen durch kleine Pfeile angezeigt.

Aus der Zeittafel für einzelne Messungen geht hervor, daß während des prospektiven Teils der Studie Meßwerte einer Reihe von Körperfunktionen während der Wachperiode alle 4 Stunden aufgezeichnet wurden, der Schlaf der Nacht aber ungestört blieb. (Abb. 12)

Die Zeitreihen der Atemstoßwerte wurden sowohl vor als auch nach der Aussonderung einzelner Werte analysiert, die kurz nach der ad hoc Medikation -zur Behandlung der Anfälle durch eine Reihe von Medikamenten, deren Einfluß auf den PEFR bekannt ist- bestimmt worden waren. Das Reinigungsverfahren der Atemstoßwerte wurde durch ein besonderes Computer-Programm ausgeführt, das für diesen Zweck nach den Kriterien der Tab. 3 geschrieben wurde. Die PEFR-Werte, die nach der Entfernung all jener Werte übrigblieben, die innerhalb der Zeitspanne aufgezeichnet wurden, in der die Wirkung ungeplanter Medikation (Notfallmedikation) anhielt, werden als korrigierte PEFR-Werte bezeichnet.

Nach einer Medikation, die als festgesetzte Routine-Therapie für die der Studie angehörenden Patienten betrachtet wurde, namentlich Prednison, Dexamethason,

Tab. Nr. 3

KRITERIEN ZUR BEWERTUNG VERABREICHTER MEDIKAMENTE UND ZUR
ELIMINATION VON ATEMSTOSSWERTEN, AUFGEZEICHNET WÄHREND DER
WIRKUNGSDAUER VON AD HOC MEDIKATION.

Zahlen neben dem Code-Wort der einzelnen Medikamente stellen Bewertungsziffern der verabreichten Therapie zur Berechnung des Anfalls- und Medikationsindex dar. In der letzten Spalte ist der Zeitraum angegeben, währenddessen Atemstoßwerte, die einer "Not"-Behandlung folgten, von der Analyse ausgeschlossen wurden.

r.	Therapie-Art (Dosis, Applikationsform)	Code	Index		Maximale Wirkungs- dauer [h]
			Anfall	Medikation	
.	Vernebler + Isuprel [1:200, 0,2 ml Aerosol- Inhalation]	NEB	1	1.0	6
.	Intermittierende, positive Druckatmung [1:200, 0,3 ml; Aerosol-Inhalation]	IPPBAIR	0.25	0.15	2
.	2. mit normaler Kochsalzlösung	IPPBNS	0.25	0.25	2
.	Vernebler mit nor- maler Kochsalzlösung	NEBNS	0.25	0.25	2
.	Pseudoephedrin	SUDAFED	0	0.25	2
.	Tedral SA [Ephedrin 48mg (16 mg-unmittelbare, 32 mg-12 h anhalten- de Erleichterung); Theophyllin 180 mg (90 mg unmittelbare, 90 mg anhaltende Erleichterung); Phenobarbital 25 mg (1:1 unmittelbare und anhaltende Erleichterung) Tabl. p.o.]	TETSA	0	0.5	8

Nr.	Therapie-Art (Dosis, Applikationsform)	Code	Index		Maximale Wirkungs- dauer [h]
			Anfall	Medikation	
7.	Ephedrin-Theophyllin- Phenobarbital [Ephedrin HCl 24 mg; Theophyllin Ca Salicylat 130 mg; Phenobarbital 25 mg Tabl. p.o.]	ETP	0	0.5	4
8.	7. + TETSA	ETPT	0	0.5	8
9.	Intermittierend positive Druck- atmung plus Isuprel	IPPB	2	2.0	6
10.	Adrenalin [Epinephrin 1:1000, 0.2 mg, s.c. Injekt.]	ADREN	3	3.0	6
11.	Aminophyllin [150-200 mg, supp.]	AMINO	3	3.0	6
12.	Sus-Phrine [1:200, 0,1 - 0,15 ml, s.c.-Injekt.]	SUSPHRIN	3	3.0	12
Steroide angegeben in Einheiten/mg; Prednison in (mg) wird als Standardeinheit betrachtet.					
13.	Hydrocortison-Na- Succinat (Solu Cortef)	SOLU CORT	5	0.25/mg	24
14.	Methylprednisolon-Na- Succinat (Solu-Medrol)	SULU MED	5	1.25/mg	24
15.	Prednison (Meticorten)	PRED	0	1.00/mg	ignoriert *
16.	Dichlorison	DS	0	1.00/mg	"
17.	Dexamethason (Deronil)	DEXA	0	10.0 /mg	"
18.	Bethamethason (Celestone)	CELEST	0	20.8 /mg	"

* Da die Medikamente 15 - 18 als Routinebehandlung galten, wurde kein Atemstoßwert, dessen Aufzeichnung auf diese Therapie folgte, von der Auswertung ausgeschlossen. Siehe Beschreibung über die Berechnung des Anfalls- und Medikations-Index.

Dichlorison und Betamethason, wurden keine Atemstoßwerte ausgesondert. Die jedoch 24 Stunden nach der Gabe von Solu-Cortef und Solu-Medrol festgehaltenen PEFR-Werte wurden von einer Auswertung ausgeschlossen.

Für die aufgezeichnete ad hoc Medikation, die zur Beherrschung von akuten Asthma-Anfällen verabreicht wurde, wurde ein Anfall-Index berechnet. In einer solchen Berechnung mußte der erwartete Effekt einer gegebenen Medikation berücksichtigt werden.

Je wirkungsvoller eine Medikation ist, die verabreicht wurde, um einen tatsächlichen Anfall zu beherrschen, desto weniger wird das erneute Auftreten von weiteren Anfällen sein und dadurch die Notwendigkeit zusätzlicher unprogrammierter Medikamente verringert.

Nach dieser Überlegung wurde den verschiedenen Medikamenten ein Anfalls- und Medikations-Index zugeordnet.

Da Prednison wie auch Dichlorison, Dexamethason und Betamethason als festgesetzte Routine- und nicht ad hoc-Therapie galt, wurden diese Medikamente im Anfallsindex aufgenommen, wie man aus der 4.Spalte der Tab. 3 ersehen kann. Die 5.Spalte derselben Tabelle zeigt wiederum, daß alle verabreichten Medikamente ohne Ausnahme für die Berechnung eines zusätzlichen Index (Medikationsbewertung), der im Zusammenhang mit der Anfallsbewertung steht, herangezogen wurden.

Mit Rücksicht auf die Cortisonpräparate wurde die Dosis in mg direkt als Bewertungsmaßstab gewählt. Prednison galt in seiner Einheit als Bezugsstandardwert. Für alle anderen verabreichten Cortisonpräparate wurde das Maß

ihrer Wirkung im Verhältnis zu der des Prednison, bezogen auf die Einheit, ausgedrückt. Wenn der Patient somit zu einer bestimmten Zeit 10 mg Prednison erhielt, so ging dies als Wert 10 in die Berechnung ein.

Dasselbe galt z.B. für Dichlorison. Dieses Medikament wurde unter anderem im Verlauf dieser Studie nur vor dem 3. Juni 1966 gegeben, da nachher für alle Routine-Cortison-Medikation Prednison alleine gewählt wurde. Als weiteres Beispiel kann Dexamethason, das in seiner Wirkung als 10mal stärker als Prednison geschätzt wird, angegeben werden. Jedem mg Dexamethason, das verabreicht war, wurde somit der Wert 10 zugeschrieben. Der Medikationswert war 50, wenn das Kind 5 mg Dexamethason erhalten hatte.

Die Mittelwerte einer Reihe von Werten für Anfalls- und Medikationsindex, wie für gereinigte und ungereinigte PEFR-Werte, wurden für eine Anzahl aufeinanderfolgender kleinerer Zeitspannen der Studie durch die Verwendung eines einfachen elektronischen Computer-Programms berechnet.

Die erhaltenen Mittelwerte für nicht überlappende Zeitspannen wurden durch andere herkömmliche statistische Tests und die Varianz-Analyse ausgewertet.

Kleinst-Quadrat-Spektren sowie Amplituden- und Phasendiagramme (Halberg et al., 1965) wurden für alle Longitudinal-Daten dargestellt. Kleinst-Quadrat-Spektren-Fenster wurden von allen Transversaldaten erhalten. Ergebnisse von "Fenstern", breiteren Spektren und/oder Amplituden- und Phasendiagrammen wurden außerdem durch den Cosinor (Halberg et al., 1967 b) als amplitudenbeschwerte Acrophase wie auch als Acrophasenschätzung, nicht durch eine Amplitude beschwert (Batschelet, 1965), zusammengefaßt.

Als zusätzliches Verfahren zur circadianen Acrophasen-schätzung wurde das "noise-to-signal"-Verhältnis angewandt (Halberg et al., 1967 b).

Dieses Verhältnis wird gebildet, wenn der Standardfehler der Amplitude, der durch das Computer-Programm der Kleinst-Quadrat-Spektren ermittelt wurde, durch die Amplitude selbst geteilt wird.

SD/C

Die Phasenreferenz für einige in dieser Arbeit dargestellten circadianen Acrophasen war die circadiane PEFR-Acrophase, die bei Kindern mit Asthma in Remission und nicht mit Cortison behandelt, bestimmt wurde.

BIOCHEMISCHE METHODEN:

- A) Biochemische Methoden, wie sie zur Analyse von verschiedenen Parametern in der klinischen Studie verwendet wurden.

An allen in der klinischen Studie gesammelten Urinproben wurden Na, K, Cl und Ca mit Hilfe eines Technicon-4-Kanal-Autoanalysators bestimmt. Ein Mehrfachanalysator, wie ihn J. Dawborn et al. (1965) konstruiert haben, wurde für die Bestimmung von Na, K und Cl verwendet, wohingegen ein Technicon-N-3a-Mehrfachanalysator für die Bestimmung von Ca gewählt worden ist. Na und K wurden durch Flammenphotometrie bestimmt. Die Methode zur Cl-Bestimmung wurde angepaßt an jene von D. Zall et al. (1956): Cl-Ionen reagieren mit Quecksilberthiocyanat und setzen Thiocyanat-Ionen frei. Diese Ionen wiederum reagieren mit Eisen-Ionen und ergeben einen roten Komplex, der in einem Colorimeter gemessen wird. Ca wurde bestimmt durch die Bildung eines farbigen Komplexes Crisolphthalein nach der Methode von Kessler und Wolfman (1964).

- B) Biochemische Analysenmethoden, wie sie in der tierexperimentellen Studie angewandt wurden.

- 1) Serumcorticosteron wurde nach der Methode von Mattingly (1962) bestimmt:

- a) Aus einer 0.4 µg/ml Standardlösung wurden 0.5 ml, 1.0 ml und 1.5 ml entnommen, in ein Teströhrchen gegeben und mit 2.5 ml destilliertem Wasser aufgefüllt,
- b) den Serumproben mit unbekanntem Corticosteron-Gehalt wurden 0.5 ml entnommen und in einem

* Die Bezeichnung "Corticosteron" wurde hier verwendet, ohne im einzelnen auf andere Substanzen hinzuweisen, die zur Fluoreszenz beigetragen haben könnten, da es höchst wahrscheinlich erscheint, daß bei den hier durchgeführten Auswertungen Corticosteron den Hauptanteil der Fluoreszenz hatte. (Solem u. Brinck-Johnsen 1965, Flack u. Stockham 1969)

- Teströhrchen mit 2.0 ml destilliertem Wasser vermengt,
 c) der Leerwert enthielt 2.5 ml destilliertes Wasser.

Allen drei Röhrchen wurde dann in einem weiteren Schritt Methylenchlorid CH_2Cl_2 zugegeben und die wässrige Phase nach Abzentrifugieren durch Aspiration entfernt. 10 ml eines jeden Methylenchloridextrakts wurden in ein anderes Röhrchen gebracht, das 3 ml eines Schwefelsäure/Alkoholgemisches (7:3) enthielt; danach erfolgte erneutes Mischen, Abzentrifugieren und Abpipettieren der Methylenchlorid-Phase. Die zurückgebliebene Säure/Alkohol-Phase wurde zur Fluoreszenzbestimmung in eine entsprechende Küvette gebracht.

Die Fluoreszenzbestimmungen selbst wurden durch ein Turner-Modell 111 Fluorimeter mit einem Blau- und Grün-Filter durchgeführt. Eine Zusammenstellung der einzelnen Schritte bei der Serumcorticosteronbestimmung in dieser Studie kann in der Appendix-Tabelle 1 gefunden werden.

2) Corticosteron^{*}-Bestimmung in homogenisierten Nebennieren:

Alle zu einem bestimmten Zeitpunkt (Zeitgruppe) gesammelten Nebennieren einzelner Tiere wurden für die Analyse gepoolt. In einer Gruppe waren 10 Röhrchen, wovon jedes 2 Nebennieren enthielt. Da die einzelnen Drüsen aber nur sehr klein waren, und eine Analyse somit nicht ermöglicht werden konnte, wurden alle Nebennieren einer Gruppe in das gleiche Homogenisierröhrchen gebracht, homogenisiert und als Gruppe analysiert. Durch diesen Umstand konnten für die Gruppen-

* s.S.58

werte keine Standardabweichungen errechnet werden.

Die für jeden Zeitpunkt in Homogenisierröhrchen zusammengebrachten Nebennieren wurden mit 1.0 ml 33% Alkohol vermengt. Dieses Nebennieren-Alkoholgemisch wurde dann homogenisiert und in ein graduiertes Zentrifugenröhrchen dekantiert. 2.0 ml destilliertes Wasser wurde daraufhin erneut in das Homogenisierröhrchen gegossen und das Gemisch nochmals kurz homogenisiert und anschließend in die Zentrifuge abdekantiert. Nach nochmaliger Wiederholung dieses Vorganges wurde das Volumen im Zentrifugenröhrchen mit destilliertem Wasser auf 5.0 ml aufgefüllt. Davon wurden 2.0 ml zur Corticosteron-Analyse entnommen (Appendix-Tab. 2).

3) Leberglycogen wurde nach der Methode von Good et al. (1933) bestimmt:

Die entnommene Leber des einzelnen Tieres wurde mit 1.0 ml 30.0% Kali-Lauge (KOH) in einem Wasserbad 20 Min. gekocht. Danach wurden zu der Leber-Kalilaugen-Lösung 1.25 ml 95% Alkohol zugefügt. Nachdem Glycogen durch Erhitzen ausgeflockt war, wurden die einzelnen Proben zentrifugiert und der Überstand durch Abgießen entfernt. Das Glycogensediment wurde nun in 10 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Nach Vermischen von 1 ml dieser Glycogen-Lösung mit 3 ml (36 n) Schwefelsäure H_2SO_4 und Erhitzen in einem Wasserbad über 7 Min. wurde nach der Methode von Mendel et al. (1950) die optische Dichte bei 520 mm abgelesen. Die Glycogenkonzentration ließ sich dann durch Vergleich mit ähnlich behandelten Glucosestandardproben berechnen.

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN zur Bestimmung der Wirkung von Methylprednisolon in Abhängigkeit einer Circadian-System-Phasen bezogenen Medikamentenapplikation bei der Maus.

Material und Methodik

I. Material-Test zur Granulomentwicklung in der Maus

Gemäß der Literatur und persönlichen Kontakten mit Wissenschaftlern am Merck-Institute for Therapeutic Research, Rahway, New Jersey, namentlich Dr. Robert H. Silber und Dr. Charles A. Winter, war kein völlig zufriedenstellendes Testmaterial bekannt. Aus diesem Grunde wurden vor der Durchführung einer Methylprednisolon-Dosis-Wirkungs-Studie Versuche durchgeführt, um ein bestimmtes Material und ein Verfahren zu finden, mit dem in einem vernünftigen Zeitraum und meßbaren Ausmaß nach Implantation ein Granulom erzeugt werden konnte.

Mehrere verschiedene Materialien wurden 30 $\pm$ 3 Tage alten Bagg Albino C-Mäusen subcutan s.c. oder intraperitoneal i.p. implantiert.

<u>Material</u>	<u>Intraperit.</u>	<u>Subcut.</u>	
	<u>Implant.</u>	<u>Implant.</u>	<u>Implant.</u>
	<u>weibl.</u>	<u>männl.</u>	<u>weibl.</u>
	<u>Mäuse</u>	<u>Maus</u>	<u>Mäuse</u>
Balsa-Holz	2	1	5
Baumwollkugeln			6
Polyester		1	3
Schwarzes Garn (Baumwolle)	2		4
Gelfoam (Gelatine)			5

Die Operationen wurden von 17.00 bis 21.00 an standardisierten Mäusen durchgeführt, die an einen Licht-Dunkel-Wechsel -Licht (L) von 07.00 - 19.00 mit Dunkelheit (D) von 19.00 - 07.00 - abwechselnd gewöhnt waren.

Die Mäuse wurden mit Äther narkotisiert. An dem für die Operation vorgesehenem Gebiet wurde der Pelz mit einem elektrischen Rasierapparat entfernt, die Fläche mit Phisohex gereinigt, anschließend mit einer Rasierklinge rasiert und dann mit Alkohol und Merfen desinfiziert. Das Material wurde subcutan in der Interscapular-Gegend implantiert, die Wunde mit ein oder zwei Wundklipps geschlossen.

Die Form der implantierten Balsaholz- und Polyesterstückchen war kubisch mit einer Kantenlänge von 3 mm.

Baumwollkugeln und schwarzes Garn (Baumwolle) wurden zu einer Kugel geformt, mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 5 mm.

Gelfoam (Gelatine)-Stückchen wurden ebenfalls implantiert und hatten ein Ausmaß von 10x10x3 mm.

Die intraperitonealen Implantationen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Der Schnitt wurde in der Mitte des Abdomen para rectal angelegt. Nach der Implantation wurde das Peritoneum und die Muskulatur mit Seide vernäht, die Haut mit Wundklipps verschlossen und anschließend mit einem Wundspray besprüht.

Die Tiere erholten sich schnell und wurden in Gruppen nach Geschlecht und implantiertem Material getrennt untergebracht. Purina Chow und Wasser ad libitum waren zur Verfügung. 3 Teelöffel von Polyotic^R (Tetracyclin Hydrochlorid lösliches Pulver) wurde jeder Gallone (3,8 l) Trinkwasser prophylaktisch zugesetzt.

8 Tage nach dem chirurgischen Eingriff wurden die Mäuse getötet, das implantierte Material einschließlich des umgebenden Gewebes entfernt und in Formalin (10% Lösung von konzentriertem Formaldehyd) fixiert. Von den entfernten Stoffen, ausgenommen Polyester, -da die mit diesem Material implantierten Tiere keinerlei bestimmbare Gewebsreaktion zeigten- wurden Gefrierschnitte angefertigt.

Die Gewebsschnitte wurden gefärbt (Haematoxin-Eosin) und mikroskopisch untersucht. Balsaholz zeigte eine deutliche Gewebsreaktion; das Stückchen Holz war stark von granulomatösem Gewebe umgeben, das teilweise oder in einigen Fällen sogar ganz den Fremdkörper infiltrierte. Aus diesem Grund wurde dieses Material für die weiteren Untersuchungen gewählt.

II) Dosis-Wirkungs-Studie (DWS)

In dieser 2. Studie galt es, auf der Basis der Körpergewichtsreduktion, einem Maß für Steroidwirkung, die dafür beste Dosis zu finden. "Solu Medrol", ein stark wasserlösliches Methylprednisolon-Natriumsuccinat, wurde als Corticosteroid gewählt, um im Hinblick auf eine mögliche Erweiterung der Ergebnisse der klinischen Corticosteroid-Therapie-Studie, die 1966 im Children's Asthma Research Institute and Hospital in Denver, Colorado, durchgeführt wurde, getestet zu werden (Reindl 1967, Reindl et al., 1969).

61 weibliche Bagg Albino C-Mäuse wurden zwischen dem 19. und 27. Tag nach der Geburt dem Muttertier entzogen und 17 Tage vor Beginn der Studie in Einzelkäfigen untergebracht. Der Raum, in dem die Käfige standen, hatte eine automatische Klimaanlage und war während der gesamten Studie temperaturkontrolliert ($25 \pm 1^{\circ} \text{C}$) und geräuschisoliert. Als Beleuchtung

wurde nur Fluoreszenz-Licht verwendet, das von 07.⁰⁰ bis 19.⁰⁰ brannte. Anschließend war Dunkelheit für den gleichen Zeitraum.

Die 61 Mäuse waren wahllos in 7 Gruppen aufgeteilt, von denen jede 9 Tiere umfaßte, ausgenommen die Kontrollgruppe mit nur 7 Mäusen. Zu Beginn der Studie hatten die Mäuse ein mittleres Körpergewicht von 18.5 ± 1.8 g (SD); sie erhielten Purina Chow Nahrung und Wasser ad libitum.

Zur Injektion wurden sterile Lösungen verschiedener Konzentration vorbereitet (0.1 μ g, 1.0 μ g, 10.0 μ g, 100.0 μ g, 1000.0 μ g, 10.000.0 μ g Methylprednisolon pro 0.1cc Lösungsmittel oder Lösungsmittel alleine für die Kontrollgruppe; Tab. 4). Das Lösungsmittel enthielt die gleiche Konzentration an Chemikalien wie das original "Solu Medrol". Nur Methylprednisolon wurde mit HCl auf einen pH-Wert von 7.48 eingestellt und durch einen Bakterienfilter gepreßt.

In einer Übersichtstabelle ist der Zeitplan der DWS-Studie zusammengestellt (Tab. 5).

Jedesmal nach Messung des Körpergewichts, täglich um 17.⁰⁰ $\pm$ 30 Min., erhielt jedes Tier (mit einer sterilen Nadel) 0.1 ml der entsprechenden Lösung intraperitoneal injiziert. Über 8 Tage wurde das Körpergewicht aufgezeichnet, am 9. Tag dann zusätzlich zur einmaligen Körpergewichtskontrolle in Abständen von 4 h mit einem Thermistor Yellow Springs Telethermometer die Temperatur gemessen. Die Körpergewichtsdaten für 9 aufeinanderfolgende Tage sind für jede Gruppe als Mittelwert mit Standardabweichung SD in Tab. 6 und mit Standardfehler (SE) in Abb. 13 angegeben.

Tab. Nr. 4

ÜBERSICHT DER VERSUCHSANORDNUNG DER SOLU-MEDROL^R-DOSIS-
WIRKUNGS-STUDIE (DWS) AN ♀ C-MÄUSEN.

Zeitpunkt der "Einzelgaben"-Injektion ($\emptyset_1$) und des
Tötens ($\emptyset_T$) ist Circadian-System-Phasen bezogen.

Gruppen: (Kontroll- und Versuchstiere)	Anzahl der Mäuse (Geschlecht(2), Alter(1), Ge- wicht)	Dosis Rx(3), L (4)
Total	61(♀,35,18.5 ± 1.5)	0.0001-10/0.1
K	7	/0.1
V-1	9	0.0001 /
V-2	9	0.001 /
V-3	9	0.01 /
V-4	8	0.1 /
V-5	9	1.0 /
V-6	9 (5)	10.0 /

1. in Tagen am ersten Behandlungstag
2. mittleres Körpergewicht zu Beginn der Studie
3. mg Solu Medrol^R (Methylprednisolon); i.p.-Injektion der Versuchstiere (V)
4. cc Lösungsmittel; i.p.-Injektion der Kontrolltiere (K)
5. Am 2. Oktober wurde ein Tier tot aufgefunden; die Gruppe reduzierte sich von dem Zeitpunkt an auf 8 Mäuse

$\emptyset_1$ 9 Tage täglich 17⁰⁰ ± 30 Min.

$\emptyset_T$ 9. Tag nach erster $\emptyset_1$

1952. VI. 3.

VERGLEICH FOLGE DER UNTERSUCHUNGEN AN Q C-MÄUSEN IN DER D W S
 Zeitpunkte der circadian-System-Phasen bezogenen "Einzelgaben" ϕ_{iRx} (2), ϕ_{iL} (3)
 und für das Töten ϕ_T (4).

Datum/Tage	17 Tage	28. Sept.	29. Sept.	30. Sept.	1. Okt.	2. Okt.	3. Okt.	4. Okt.	5. Okt.	6. Okt.
Adaptionsperiode (1)										
Körpergewicht z.Ztp. ϕ_i (Rx, L)										
ϕ_i (Rx, L)										
Rektaltemperatur T=24h; $\Delta t=4h$										
ϕ_T										
Organgewichte Leber, Milz, Neben- niere, z.Ztp. ϕ_T										

1. 19 bis 27 Tage nach Entwöhnungen vom Muttertier im LD Wechsel (L:O700-1900)
2. i.p.-Injektion der Versuchstiere tgl. 17⁰⁰ ± 30 Min. mit Solu Medrol (Methylprednisolon)
3. i.p.-Injektion der Kontrolltiere tgl. 1700 ± 30 Min. mit Lösungsmittel ohne Cortison.
4. Dekapitation z.Ztp, der üblichen ϕ_i (Rx, L)

DOSIS-WIRKUNGS-STUDIE

KÖRPERGEWICHTS-ÄNDERUNG

bei ♀ C-Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener "Einzelgaben"-Injektion
von Solu Medrol (ϕ_{1x}) und Lösungsmittel (ϕ_{1L})

- ϕ_{1x} : Phase der 1 mg Solu-Medrol (Methylprednisolon)-i.p.-Injektion bei Versuchstieren)
 ϕ_{1L} : Phase der 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide)-i.p.-Injektion bei Kontrolltieren)
 * : am 2. Oktober wurde ein Tier tot aufgefunden. Die Gruppe reduzierte sich auf 8 Mäuse
 LD : L: 0700 - 1900 - D: 1900 - 0700

1967												
Grp. Nr.	Anzahl Mäuse pro Gruppe	Dosis in mg	9.-28.	9.-29.	9.-30.	10.- 1.	10.- 2.	10.-3.	10.-4.	10.-5.	10.-6.*	
			Mittelwerte (g) $\bar{X} \pm$ Standardabweichung SD									
			$\bar{X}$	$\pm$ SD	$\bar{X}$	$\pm$ SD	$\bar{X}$	$\pm$ SD	$\bar{X}$	$\pm$ SD	$\bar{X}$	$\pm$ SD
Kontr.	7	0.0	18.4	0.9	17.8	1.0	17.9	1.1	17.7	1.2	17.5	1.1
I	9	0.1	18.6	2.1	18.6	2.2	18.7	2.0	18.4	1.9	18.4	2.0
II	9	1.0	18.0	0.9	17.7	1.1	17.6	1.2	17.4	1.3	17.3	0.9
III	9	10.0	17.8	0.9	17.4	1.2	17.5	0.9	17.5	1.0	17.1	1.1
IV	8	100.0	18.3	2.9	18.0	2.8	18.5	2.2	18.5	2.0	17.7	2.5
V	9	1000.0	17.9	1.7	17.3	1.5	17.0	1.3	17.0	1.4	16.4	1.5
VI	9	10000.0	17.4	2.5	16.5	2.4	16.3	2.3	16.0	2.3	15.7	2.2

Dosis-Wirkungs-Studie

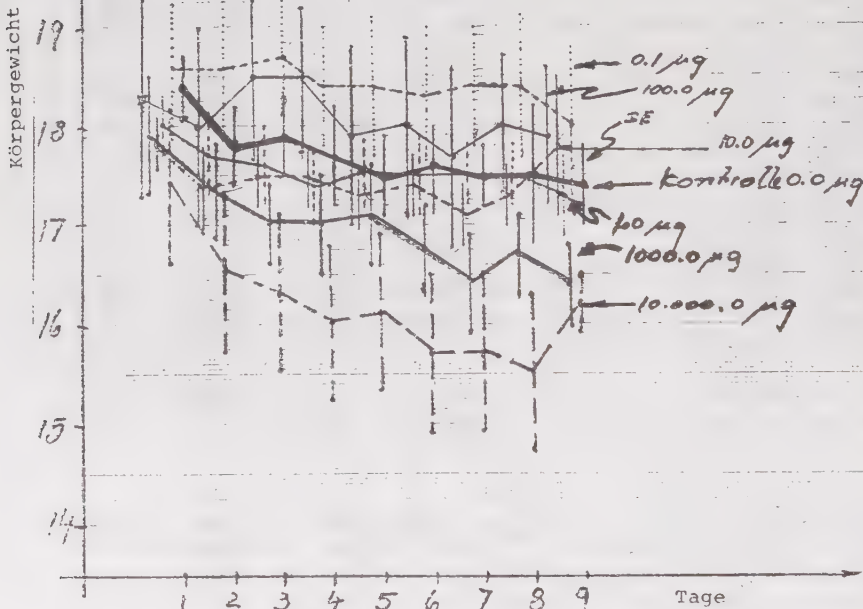
Körpergewicht

Körpergewichtsänderung ($\bar{X} \pm SE$) bei ♀ C-Mäusen * nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener "Einzelgaben"-Injektion von unterschiedlichen Dosen Solu Medrol (ϕ_{iR}) und Lösungsmittel (ϕ_{iL}). Deutliche Gewichtsreduktion bei Dosen von 1 mg und 10 mg R_x .

* aufgeteilt in LD: Licht (07⁰⁰-19⁰⁰)-Dunkel (19⁰⁰-07⁰⁰) synchronisierte 6 vergleichbare Versuchsgruppen (je 8 - 9 Tiere) und 1 Kontrollgruppe (7 Tiere).

ϕ_{iR} = Phase der i.p.-Injektion von Solu Medrol (Methylprednisolon 0.1 μ g bis 10 mg)

ϕ_{iL} = Phase der i.p.-Injektion von 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide) } 17⁰⁰ $\pm$ 30 Min.



Behandlungsdauer bei tgl. "Einzelgaben"-Injektion von R_x

Die graphische Darstellung zeigt deutlich eine Gewichtsreduktion mit zunehmender Steroiddosis, besonders bei den Dosen von 1.0 mg/10g oder 10.0 mg/10g Körpergewicht (Abb. 14).

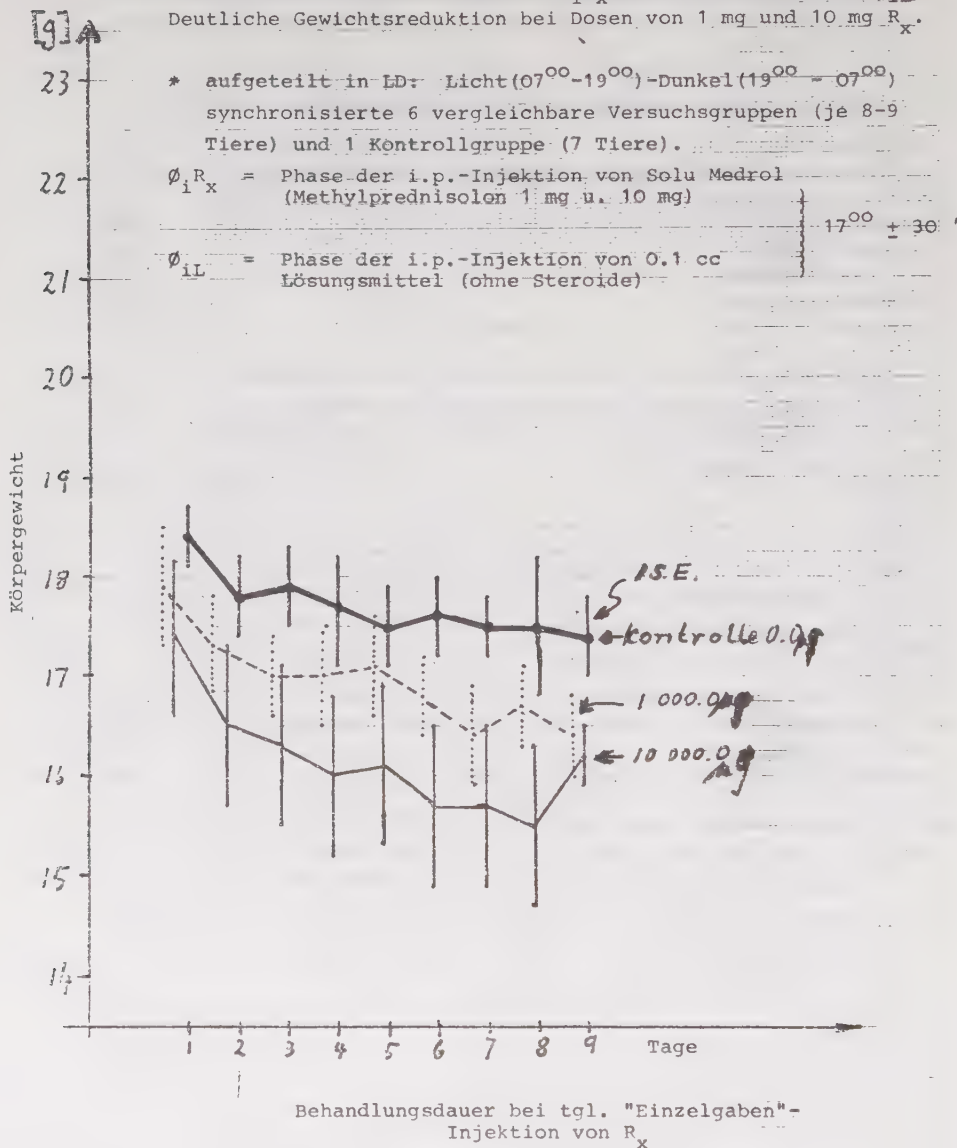
24 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet. Körpergewichts- und Temperaturmessung wurde kurz vor dem Töten nochmals vorgenommen. Leber, Nebenniere und Milz wurden entfernt und ebenfalls gewogen. In Tab. 7 und Abb. 15 sind die Gruppen-Mittelwerte mit SD (SE) für die drei verschiedenen Organe angegeben.

In Tab. 8 und Abb. 16 sind für die verschiedenen Gruppen Rektaltemperaturwerte über 24 Stunden als Mittelwerte mit SD und SE aufgezeichnet und graphisch dargestellt.

Bei Überprüfung aller Dosis-Wirkungs-Daten wurde deutlich, daß die 1 mg/10g Körpergewichtsdosis zu einer drastischen Milzgewichtsreduktion in dem für diesen Test gewählten circadianen Stadium geführt hatte. Da das Körpergewicht ebenfalls im Verlauf der 9 Tage einen Abfall unter der 1 mg/10g Körpergewichts-Dosis zeigte, wurde diese Tatsache als ein weiteres Kriterium für die Wahl dieser Dosis hinsichtlich der rund-um-die-Uhr-Studie gewertet. Die 10 mg/10 g Körpergewichtsdosis schien zu hoch zu sein, da ein Tier der Gruppe, die diese Dosis erhielt, innerhalb einer Woche nach Injektion starb.

Abb. 14
Dosis-Wirkungs-Studie
Körpergewicht

Auszug aus Abb. 13 Körpergewichtsänderung ($\bar{x} \pm SE$) bei ♀ C-Mäusen * nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener "Einzelgaben"-Injektion von unterschiedlichen Dosen Solu Medrol (ϕ_{iR}) und Lösungsmittel (ϕ_{iL}).
Deutliche Gewichtsreduktion bei Dosen von 1 mg und 10 mg R_x .



DOSIS-WIRKUNGS-STUDIE

ORGAN-GEWICHTS-ÄNDERUNG (Leber, Milz, Nebenniere)

bei 0-C-Mäusen: Tötung (ϕ_T) der Tiere nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener "Einzelgaben"-Injektion von unterschiedlichen Dosen Solu Medrol (ϕ_{iX}) und Lösungsmittel (ϕ_{iL}) um 17 Uhr $\pm$ 30 Min.

ϕ_{iR} : Phase der 1 mg Solu-Medrol (Methylprednisolon)-i.p.-Injektion bei Versuchstieren } 17⁰⁰ $\pm$ 30 Min
 ϕ_{iL} : Phase der 0,1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide)-i.p.-Injektion bei Kontrolltieren
 ϕ_T : Phase der Dekapitation, Entnahme der Organe und sofortiges Wiegen 19⁰⁰ - 19⁰⁰; D:19⁰⁰ - 07⁰⁰

Gruppe Nr.	Anzahl Mäuse pro Gruppe	Dosis in mg	O r g a n e					
			L e b e r		M i l z		N e b e n n i e r e	
			Mittelwerte $\bar{X}$ (mg) $\pm$ Standardabweichung SD					
			X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD
control	7	0.0	758.7	35.9	74.5	15.9	11.0	3.5
I.	9	0.1	776.5	92.5	81.2	8.5	11.3	3.2
II.	9	1.0	738.1	45.6	71.1	10.1	11.8	4.0
III.	9	10.0	702.4	77.6	70.3	5.2	10.9	3.0
IV.	8	100.0	813.6	102.7	69.9	7.7	11.4	2.0
V.	9	1000.0	713.7	47.5	58.2	13.8	11.3	1.9
VI.	8	10000.0	1020.8	94.0	33.8	6.0	10.0	3.3

Zu Abb. 15

Dosis-Wirkungs-Studie
Organgewichte

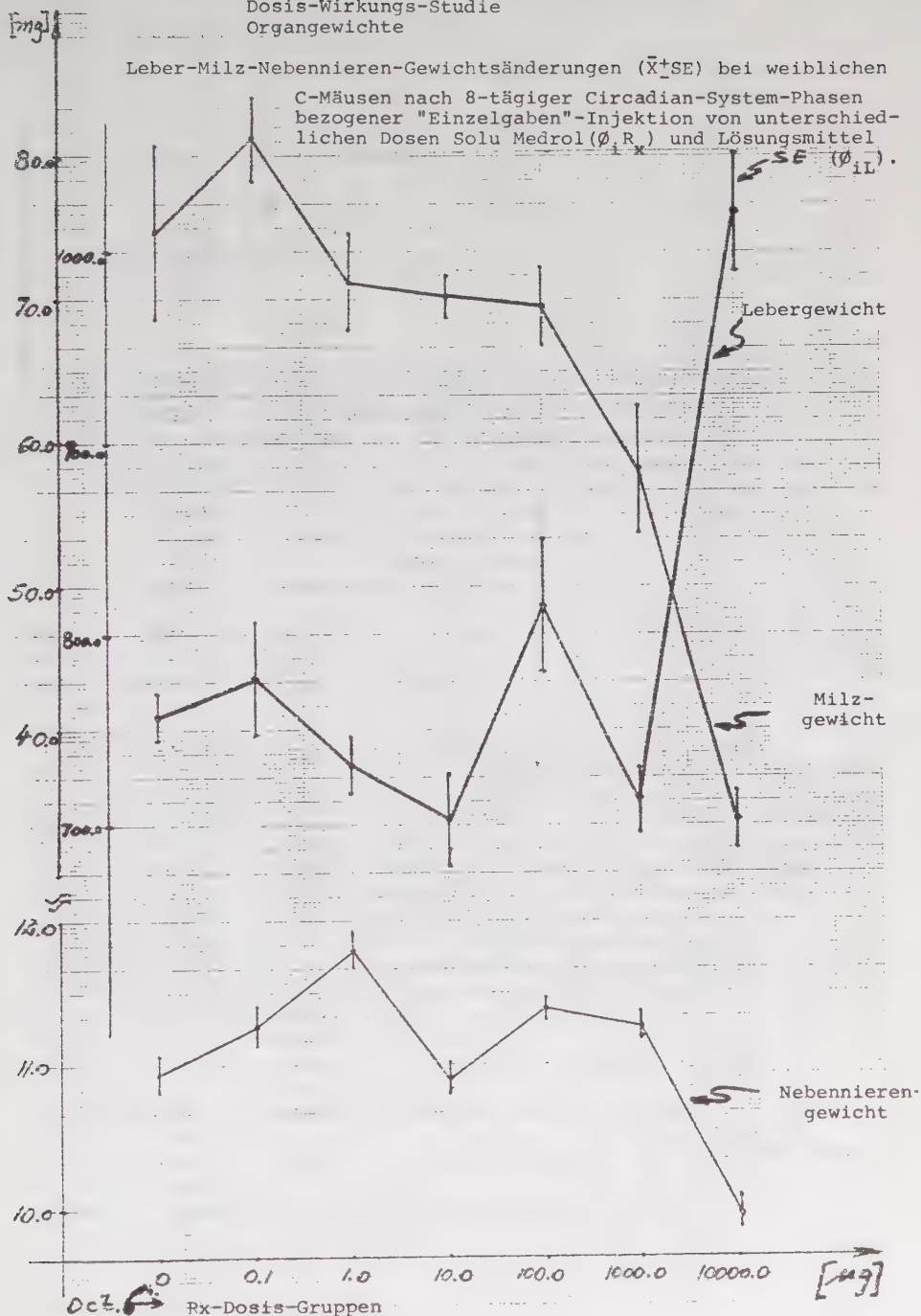
Leber-Milz-Nebennieren-Gewichtsänderung ($\bar{X} \pm SE$) bei
♀ C-Mäusen * nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen
bezogener "Einzelgaben"-Injektion von unterschiedlichen
Dosen Solu Medrol ($\emptyset_{iR_x}$) und Lösungsmittel ($\emptyset_{iL}$).

Dekapitation $\emptyset_T$ und Entfernung der Organe 24 h nach
letzter R_x -Applikation.

* aufgeteilt in LD: L (07⁰⁰ - 19⁰⁰)-Dunkel (19⁰⁰ - 07⁰⁰)
synchronisierte 6 vergleichbare Versuchsgruppen (je
8 - 9 Tiere) und 1 Kontrollgruppe (7 Tiere).

$\emptyset_{iR_x}$	= Phase der i.p.-Injektion von Solu Medrol (Methylprednisolon 0,1 μ g bis 10 mg)	} 17 ⁰⁰ $\pm$ 30 Min.
$\emptyset_{iL}$	= Phase der i.p.-Injektion von 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide)	
$\emptyset_T$	= Tötung der Tiere zum Zeitpunkt $\emptyset_{iR_x/L}$	

1. Exzessiver Gewichtsanstieg bei 10 mg-Dosis. 1 mg-Dosis zeigt keine wesentliche Änderung gegenüber Kontrollen
2. Deutliche Milzgewichtsreduktion bei 1.0 und 10.0 mg R_x
3. Signifikant stärkere Nebennierengewichtsverminderung erst bei 10 mg-Dosis.



DOSIS-WIRKUNGS-STUDIE

REKTALTEMPERATUR-ÄNDERUNG

bei ♀ C-Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogenen "Einzelgaben"-
Injektion von Solu Medrol (ϕ_{iR_x}) und Lösungsmittel (ϕ_{iL})

Messungen/ alle $\Delta t = 4$ h über Gesamtzeit $T = 24$ h; $\Delta D: \Delta 07^{00} - 19^{00}$ D: $19^{00} - 07^{00}$
 ϕ_{iR_x} : Phase der 1mg Solu-Medrol (Methylprednisolon) i.p.-Injektion bei Versuchstieren }
 ϕ_{iL} : Phase der Lösungsmittel (ohne Steroide, 0.1ccli.p.-Injektion bei Kontrolltieren) } $17^{00} \pm 30$ Min

1967

Gruppe Nr.	Anzahl Mäuse pro Gruppe	Dosis in mg	1967													
			5. Oktober						6. Oktober							
			Uhrzeit													
			16.00	20.00	0.00	04.00	08.00	12.00	16.00							
Mittelwerte ($^{\circ}\text{C}$) $\bar{X} \pm$ Standardabweichung SD																
			X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD		
control	7	0.0	36.9	0.6	38.6	0.4	38.3	0.2	36.7	0.4	36.5	0.5	36.7	0.5	36.3	0.6
I.	9	0.1	35.9	1.8	38.3	0.2	37.9	0.3	36.3	0.6	36.6	0.6	36.3	0.2	36.3	0.4
II.	9	1.0	36.9	0.4	38.4	0.3	38.2	0.4	36.5	0.8	36.9	0.8	36.9	0.5	36.3	0.4
III.	9	10.0	36.8	0.4	38.2	0.5	38.2	0.2	36.4	0.7	36.9	0.8	36.4	0.4	36.1	0.3
IV.	8	100.0	36.2	2.3	38.0	0.6	37.8	0.3	36.8	0.2	37.1	0.5	37.0	0.3	36.1	0.2
V.	9	1000.0	37.2	0.3	38.2	0.4	38.1	0.4	36.4	0.4	37.2	0.8	36.9	0.7	36.0	0.2
VI.	8	10000.0	38.2	0.4	34.0	2.9	37.9	0.5	37.9	0.4	38.1	0.3	37.9	0.2	37.0	0.6

Zu Abb.16

Dosis-Wirkungs-Studie
Rektaltemperatur

Circadianrhythmische Temperaturänderungen ($\bar{X} \pm SE$) bei ♀ C-Mäusen* nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogenen "Einzelgaben"-Injektionen von unterschiedlichen Dosen Solu Medrol ($\emptyset_{iR_x}$) und Lösungsmittel ($\emptyset_{iL}$).

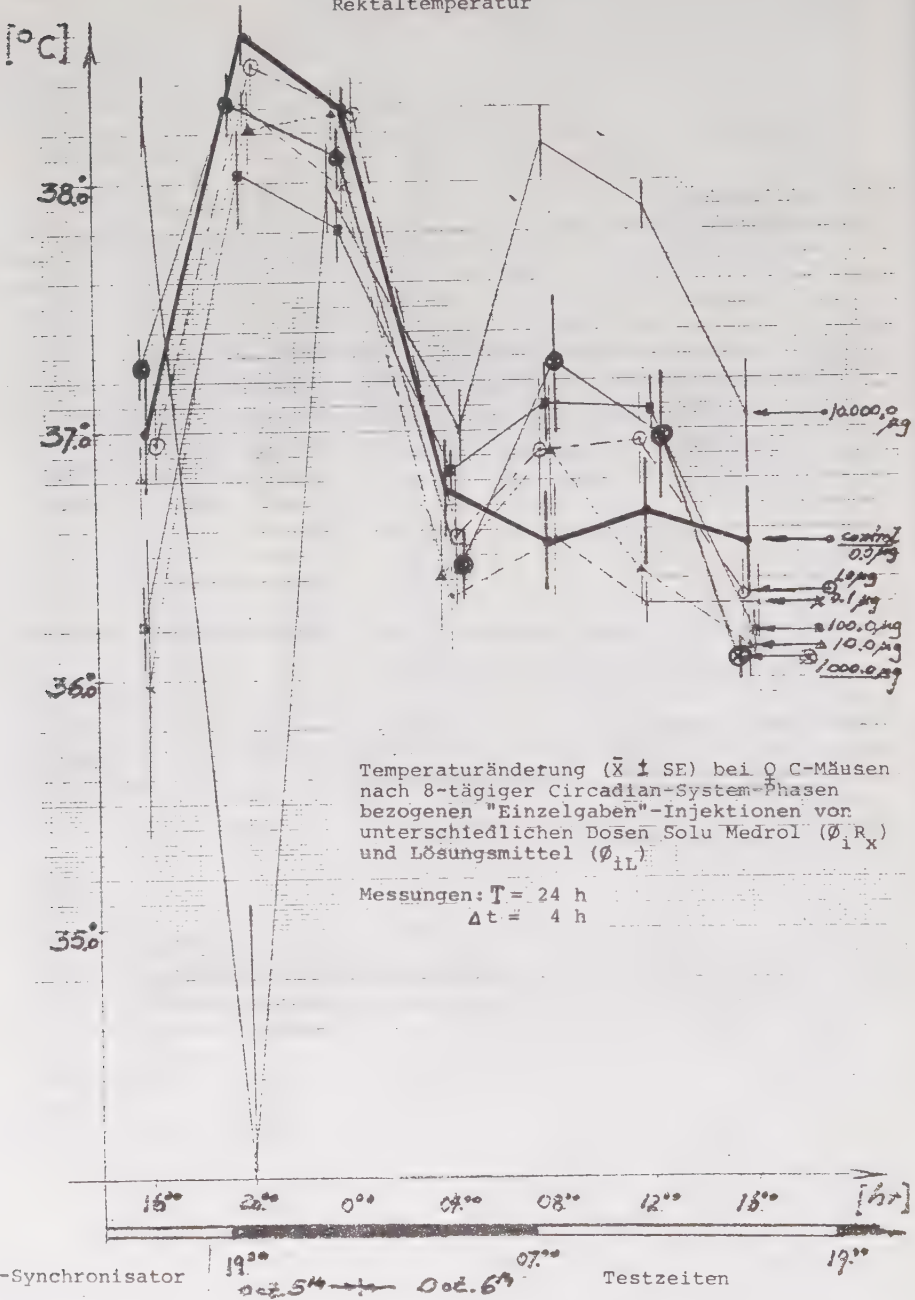
* 6 vergleichbare Versuchsgruppen (je 8 - 9 Tiere) und Kontrollgruppen (7 Tiere).

$\emptyset_{iR_x}$	= Phase der i.p.-Injektion von Solu Medrol (Methylprednisolon 0,1 mg bis 10 mg)	} $17^{00} \pm 30^i$ Min.
$\emptyset_{iL}$	= Phase der i.p.-Injektion von 0.1 cc Lösungsmittel	

Testdauer $\uparrow$ = 24 h; Intervall Δt = 4 h

Temperaturkurven für Kontroll- und Versuchsgruppen zeigen einen angedeutet sinusförmigen Verlauf, wobei die der 10 mg Dosis R_x -Gruppe eine deutliche (Phasen)-Änderung erkennen läßt.

Dosis-Wirkungs-Studie
Rektaltemperatur



III) Methylenprednisolon-Wirkung in Bezug auf das Circadian-Phasen-System zum Zeitpunkt der Medikamentenapplikation

129 noch nicht geschlechtsreife, weibliche Bagg Albino C-Mäuse (25 ± 6 Tage alt) wurden 9 Tage vor Beginn der Versuche in Einzelkäfigen unter kontrollierten Bedingungen gehalten (Halberg, 1959).

Ein Histogramm des Körpergewichts dieser 129 Mäuse wurde gezeichnet. Es zeigte einen Gewichtsbereich von 5.0 bis 18.0 g. Der Mittelwert dieser Gewichte mit Standardabweichung SD wurde als 10.2 ± 2.5 g berechnet. Tiere mit Gewichten jenseits des Mittelwertes ± 2 SD (i.e. jenseits eines Bereiches von 5.2 bis 15.2 g) wurden von der Studie ausgeschlossen; 118 Tiere blieben für die eigentliche Studie übrig und wurden nach Gewicht "geschichtet". Genauer gesagt, ein Histogramm wurde angefertigt, in dem die Tiere gemäß einzelner Schritte von 0.1 g aufgeteilt waren. Tiere aus jeder Schicht wurden dann auf 12 Gruppen aufgeteilt, 6 Versuchs- und 6 Kontrollgruppen.

Drei geräuschisolierte und mit Klimaanlage versehene Räume (25°C) wurden für die Studie vorbereitet und die Tiere der Versuchs- und Kontrollgruppen gleichermaßen auf diese 3 Räume verteilt; Störfaktoren wurden so niedrig als möglich gehalten. In einem Raum waren 4 Tiere jeder Gruppe, in den beiden anderen Räumen jeweils nur 3 einer jeden Gruppe untergebracht. Künstliches Fluoreszenz-Licht alleine wurde während der Adaptations-Periode und während der eigentlichen Studie verwendet. Licht brannte von 07.00 bis 19.00 Ortszeit. Die Dunkelperiode erstreckte sich von 19.00 bis 07.00 Ortszeit.

Die Tiere erhielten Purina Chow Nahrung und Trinkwasser mit prophylaktisch beigegebenem Tetracyclin ad libitum.

DURCHFÜHRUNG der OPERATION

Balsaholz wurde in kubische Stückchen geschnitten. Das Durchschnittsgewicht des Holzstückchens war $4,15 \pm 0,26$ SD, $\pm 0,05$ SE g. Diese Holzstückchen wurden 3mal innerhalb 36 Stunden sterilisiert und den Tieren nach dem vorbeschriebenen Verfahren intraperitoneal implantiert. Anästhesiert wurden die Tiere vor diesen Maßnahmen durch ebenfalls i.p. injiziertes Nembutal.

9 Tage nach Adaptation des vorher angegebenen Licht-Dunkel-Wechsels wurden den Paaren 1-6 (6 Versuchs- und 6 vergleichbare Kontroll-Gruppen, von denen je 2 Gruppen ein Paar bildeten) im 4-Stunden-Intervall fortlaufend die Uhrzeiten: 09.00, 13.00, 17.00, 21.00, 01.00, 05.00, zugeordnet. Zu jeder dieser Zeiten wurde einer Gruppe der Versuchsmäuse und einer Gruppe der Kontrollmäuse Balsaholzstückchen implantiert. Unmittelbar vor der Implantation erhielten alle Tiere die erste i.p. Injektion (den Versuchstieren wurde Methylprednisolon * gegeben, den Kontrolltieren nur das Lösungsmittel). Die oben angegebenen Injektionszeiten wurden gewählt unter Berücksichtigung der erwarteten höchsten (17.00) und niedrigsten (05.00) Nebennieren- und Serum-Corticosteron-Konzentration, wie sie aus entsprechenden Studien unter vergleichbaren Bedingungen bekannt sind (Nelson et al., 1966; Galicich et al., 1963; Ungar und Halberg, 1962).

* Methylprednisolon wurde von der Upjohn Company Kalamazoo, Michigan, als Solu-Medrol^R freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das original Solu Medrol^R, ein Methylprednisolon, das in der Konzentration von 125 mg/2cc im Handel ist, wurde auf eine Konzentration von 1mg pro 0.1cc Lösungsmittel verdünnt und das Lösungsmittel selbst, wie oben angeführt, zubereitet. 1 mg des Steroidhormons wurde täglich jedem Versuchstier einer Gruppe, bezogen auf ein gegebenes Circadian-Phasen-System, zur gleichen Uhrzeit nur soweit injiziert, daß keine Rhythmusänderung auftrat. Das durchschnittliche Körpergewicht jeder Gruppe wurde als $9.8 \pm 2.2g$ berechnet. Die Durchschnittshormondosis war 1.02 mg pro 10g Körpergewicht.

Die Solu Medrol-Dosis wurde nach dem berechneten Ausgangskörpergewicht und nicht gemäß der Zu- oder Abnahme des Gewichts verabreicht. Somit erhielten alle Versuchstiere während der gesamten Studie die ursprüngliche Steroidmenge, nämlich 1.02 mg pro 10g Körpergewicht, bezogen auf das Originalgewicht der einzelnen Maus. Die Kontrolltiere erhielten entsprechend nur 0.1 cc des Lösungsmittels injiziert.

Störfaktoren während der Operation und der täglichen Injektion wurden so niedrig als möglich gehalten. Jede Maus wurde aus dem Käfig geholt, in einen separaten Raum gebracht und dort injiziert. Zu den Injektionszeiten 09.00, 13.00 und 17.00 war zum Ergreifen der Tiere kein zusätzliches Licht erforderlich, wohingegen in der Dunkelheit (21.00, 01.00 und 05.00) ein kleines schwaches Taschenlampenlicht zum Auffinden der Tiere diente. Die Durchschnittszeit für die Injektion aller Tiere zu einem Zeitpunkt betrug ungefähr 25 ± 5 Min.

Kurz vor der Operation (1 und 2 Tage) wurden 2 sehr schwache Tiere der 13.00- und 21.00-Gruppe tot aufgefunden. Diese Versuchsgruppen wurden schließlich weiter auf 9 Mäuse in der 13.00- und auf 8 Mäuse in der 21.00-Gruppe reduziert.

Die Kontrollgruppe um 21.⁰⁰ bestand ebenfalls nur aus 9 Mäusen. Zur selben Zeit, zu der die Operation durchgeführt und zu der die Tiere getötet wurden (9 Tage nach Beginn der Injektionsserie), wurde Körpergewicht und Temperatur gemessen.

Am 8. Tag nach Beginn der Injektion, einen Tag also vor Tötung der Tiere, wurde zu jedem Zeitpunkt, unmittelbar vor Injektion der einzelnen Maus, nur das Körpergewicht festgehalten. Die Körpergewichtskontrolle an diesem 8. Tag der Studie wurde vorgenommen, um innerhalb der verschiedenen Gruppen und zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen eine Gewichtsveränderung festzustellen (vgl. Gewichts-Tab. 9-11 und Abb. 17-19). Zwischen dem Tag der Operation und dem 8. Tag der Studie war eine ausgeprägte Gewichtsänderung zwischen den 6 verschiedenen Solu-Medrol^R-behandelten Gruppen aufgetreten und darin eine ausreichende Wirkung der wiederholten Injektionen gesehen worden. Diesem Ergebnis zufolge wurde die Studie 24 Stunden nach der letzten Injektion beendet.

Am 9. Tag nach Beginn der Injektionen (Abb. 20) wurden die Tiere der verschiedenen Versuchs- und Kontrollgruppen, 24 h nach der letzten Injektion, rund um die Uhr getötet. Vor der Dekapitation mit einer Schere wurden die Mäuse gewogen und die Rektaltemperatur gemessen, nachher das Blut der Mäuse aus jeder Gruppe in jeweils einzelnen Teströhrchen gesammelt. Nach Eröffnung des Abdomens der Maus und allgemeiner Durchsicht nach pathologischen Veränderungen wurden das Balsaholz mit dem umgebenden Gewebe, die Nebenniere, Milz und Leber entfernt. Unmittelbar darauf wurden die Organe gewogen und die Nebenniere wie auch die Leber für weitere biochemische Analysen eingefroren. Die Balsaholzstückchen aller Tiere der Kontrollgruppen waren mit den Eingeweiden oder anderem Gewebe verklebt und stark von Granulomgewebe umgeben.

Die Balsaholzstückchen der Versuchstiere waren nur

SOLU MEDROL-EMPFFINDLICHKEITS-STUDIE

KÖRPERGEWICHT

Ausgangsgewicht von Versuchs- und Kontrollgruppen 8 Tage vor Studienbeginn
Messungen: 17⁰⁰ LD: L 07⁰⁰ - 19⁰⁰; D 19⁰⁰ - 07⁰⁰

		4. Oktober 1967									
G r u p p e n		Uhrzeit *									
(10 ♀ Bagg Albino C-Mäuse) pro Gruppe		09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	01 ⁰⁰	05 ⁰⁰				
		Mittelwert (g) ± Standardabweichung SD									
X	+SD	X	+SD	X	+SD	X	+SD	X	+SD	X	+SD
9.7	2.3	9.9	2.4	9.6	2.0	10.4	1.8	9.8	2.0	9.8	2.0
Versuchs-Gruppen											
Kontroll-Gruppen		9.8	2.0	9.8	2.0	9.8	2.0	10.0	2.0	9.8	2.0
										10.1	2.6

* Uhrzeiten, zu denen ab 13. Oktober den Versuchstieren Solu-Medrol (Methylprednisonol), den Kontrolltieren Lösungsmittel (ohne Steroide) i.p. injiziert wurde.

** 9 Mäuse in der Gruppe

*** 8 Mäuse in der Gruppe

SOLU MEDROL-EMPFINDLICHKEITS-STUDIE

KÖRPERGEWICHT

Bei Beginn der Studie zu verschiedenen Circadian-System-Phasen bezogenen Injektionszeiten ($\phi_{1x/L}$)*

G r u p p e n (10 ♀ Bagg Albino C-Mäuse)		13./14. Oktober 1967									
		Uhrzeit									
		09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	05 ⁰⁰					
Mittelwert (g) ± Standardabweichung SD											
X	$\bar{x}$ SD	X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD
14.6	2.0	14.5	2.8	14.7	2.6	15.3	1.4	15.3	1.9	15.0	3.0
			**				***				
14.9	1.3	14.7	1.4	12.7	3.1	15.4	1.5	14.7	2.7	14.5	3.7
							**				

* ϕ_{1x} = Phasen der 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon) i.p.-Injektion bei Versuchstieren

ϕ_{1L} = Phasen der 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide) i.p.-Injektion bei Kontrolltieren

Messungen: z.ztpkt. $\phi_{1x/L}$; LD: (L: 07⁰⁰-19⁰⁰; D: 19⁰⁰-07⁰⁰)

**

KÖRPERGEWICHT

8 Tage nach Beginn der Studie zu verschiedenen Circadian-System-Phasen bezogenen Injektionszeiten ($\phi_{1x/L}$) *

Messungen: Zum Zeitpunkt $\phi_{1x/L}$ LD (L : 0.7⁰⁰ - 19⁰⁰; D: 19⁰⁰ - 07⁰⁰)

		20./21. Oktober 1967											
		Uhrzeit											
		09 ⁰⁰		13 ⁰⁰		17 ⁰⁰		21 ⁰⁰		01 ⁰⁰		05 ⁰⁰	
		Mittelwert (g) ± Standardabweichung SD											
		X	±SD	X	±SD	X	±SD	X	±SD	X	±SD	X	±SD
Gruppen (10 ♀ Bagg Albino C-Mäuse) pro Gruppe	Versuchs-Gruppen	13.7	1.9	13.7	2.5	14.0	2.0	13.9	1.3	14.3	1.4	13.3	2.5
	Kontroll-Gruppen	15.3	1.9	15.3	1.3	14.0	2.0	15.3	1.4	15.2	1.8	14.2	3.1

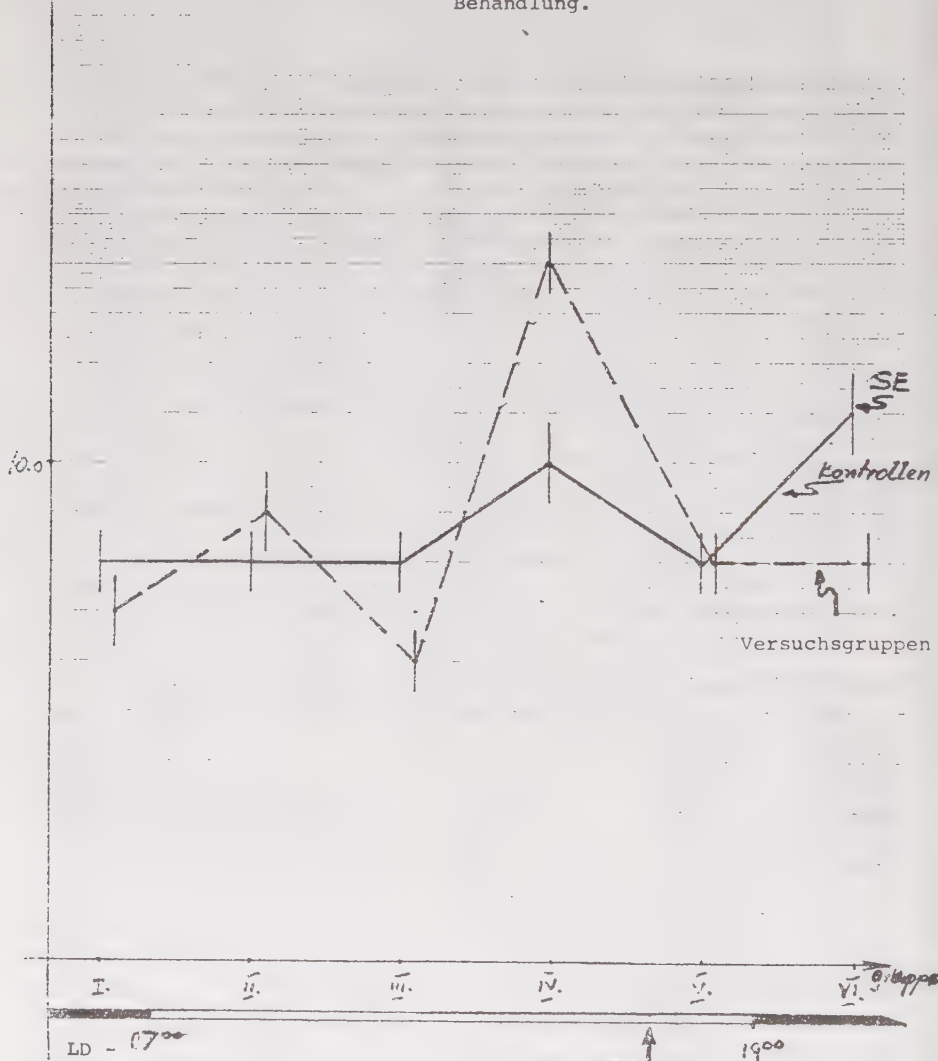
* ϕ_{1x} = Phasen der 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon)i.p.-Injektion bei Versuchstieren
 ϕ_{1L} = Phasen der 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide)i.p.-Injektion bei Kontrolltieren

** 9 Mäuse in der Gruppe
*** 8 Mäuse in der Gruppe

Abb. 17

Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie Körpergewicht

Ausgangskörpergewicht gemessen an ♀ C-Mäusen (6 Kontroll- und Versuchsgruppen von je 10 Tieren) 8 Tage vor Beginn der Studie (4. Okt. 1967, 17⁰⁰) ohne vorausgehender Behandlung.



Zeitpunkt der
Gewichtsmessung
bei Gruppen I - VI

Zu Abb. 18

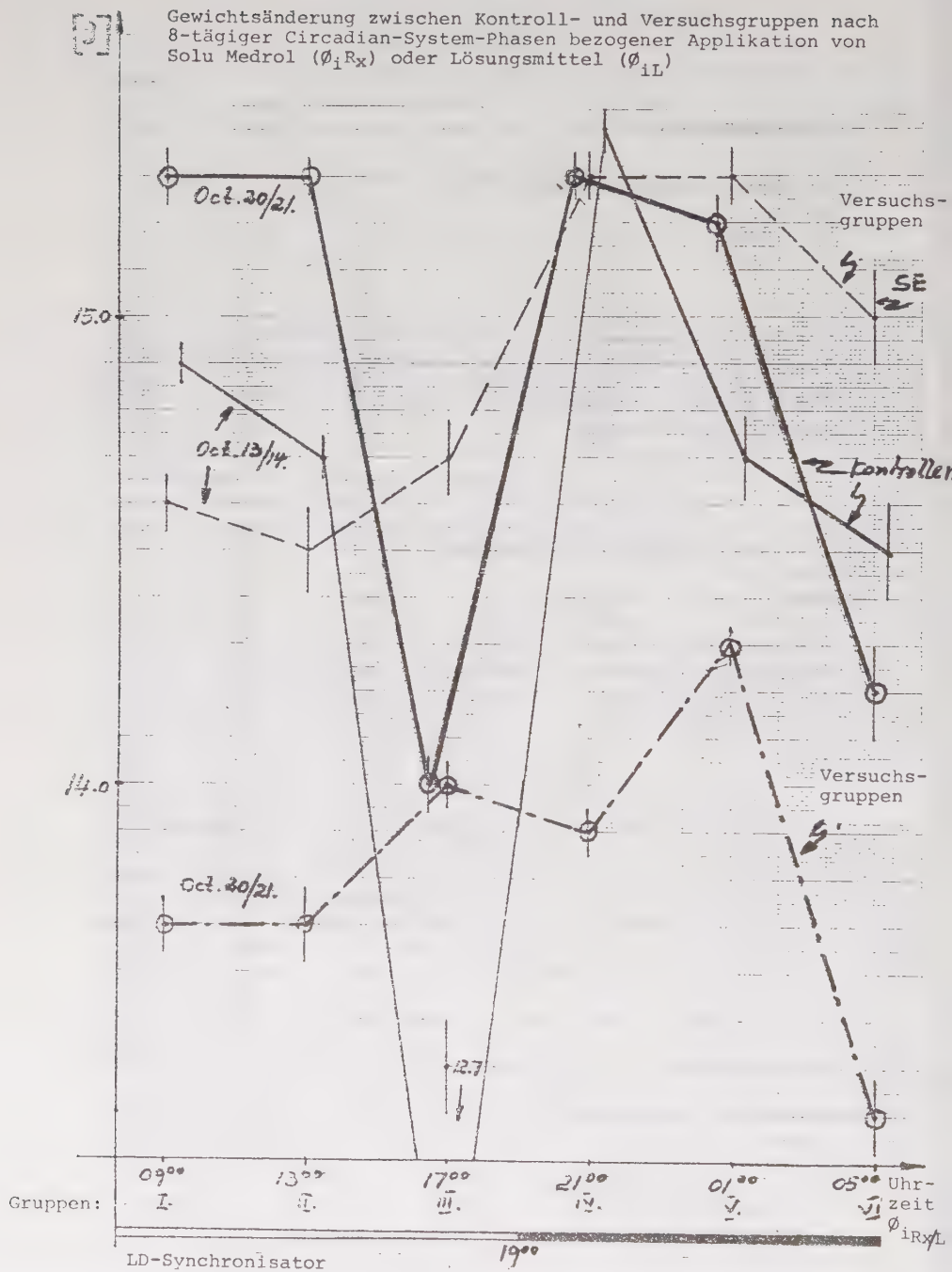
Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie
Körpergewicht

Gewichtsänderung zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen ♀ C-Mäuse nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Applikation von Solu Medrol $\emptyset_{iR_x}$ oder Lösungsmittel $\emptyset_{iL}$.

- $\emptyset_{iR_x}$ = Phasen der i.p.-Injektion von 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon)
 $\emptyset_{iL}$ = Phasen der i.p.-Injektion von 0,1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide)

Eine deutlich sichtbare Gewichtsreduktion der Versuchstiere verglichen mit dem Gewicht der Kontrollen zeigt einen ausgeprägten Effekt der 8-tägigen Cortisonbehandlung.

Gewichtsänderung zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Applikation von Solu Medrol (ϕ_{iRx}) oder Lösungsmittel (ϕ_{iL})



Zu Abb. 19

Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie
Körpergewicht

Gewichtsänderung zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen
nach 9-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener
Applikation von Solu Medrol ϕ_{iR_x} - oder Lösungsmittel ϕ_{iL} .

Letzte Messung unmittelbar vor Dekapitation, ϕ_T .

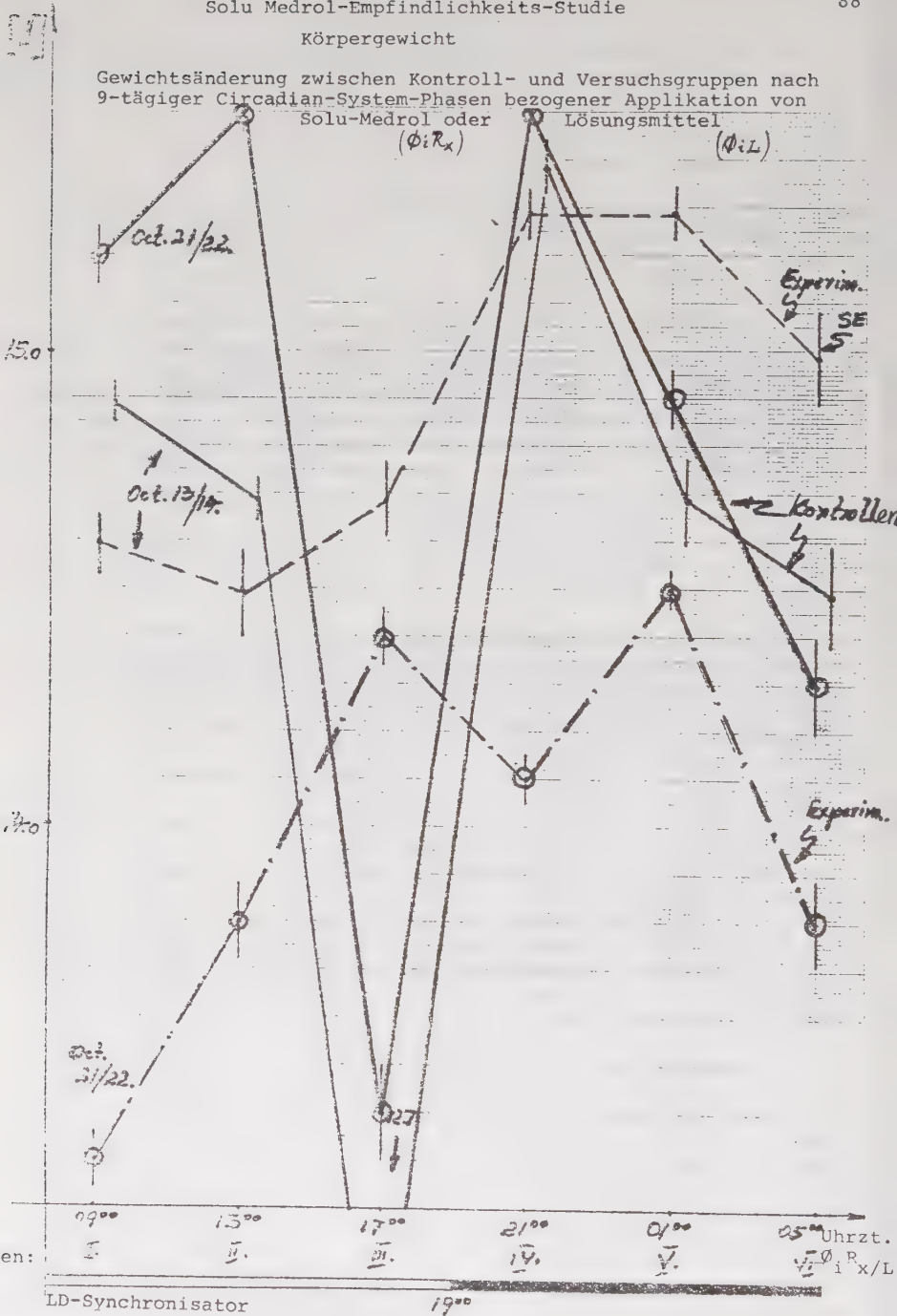
ϕ_{iR_x} = Phasen der i.p.-Inj. von 1 mg Solu-Medrol
(Methylprednisolon)

ϕ_{iL} = Phasen der i.p.-Inj. von 0.1 cc Lösungsmittel
(ohne Steroide)

Ein Vergleich der Gewichtsunterschiede zwischen Beginn
und Ende der ϕ_{RX} -Behandlung zeigt eine deutliche Gewichts-
reduktion bei den Versuchsgruppen mit scheinbar unter-
schiedlicher Intensität.

Körpergewicht

Gewichtsänderung zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen nach 9-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Applikation von Solu-Medrol oder Lösungsmittel

 $(\Phi:R_x)$ $(\Phi:L)$ 

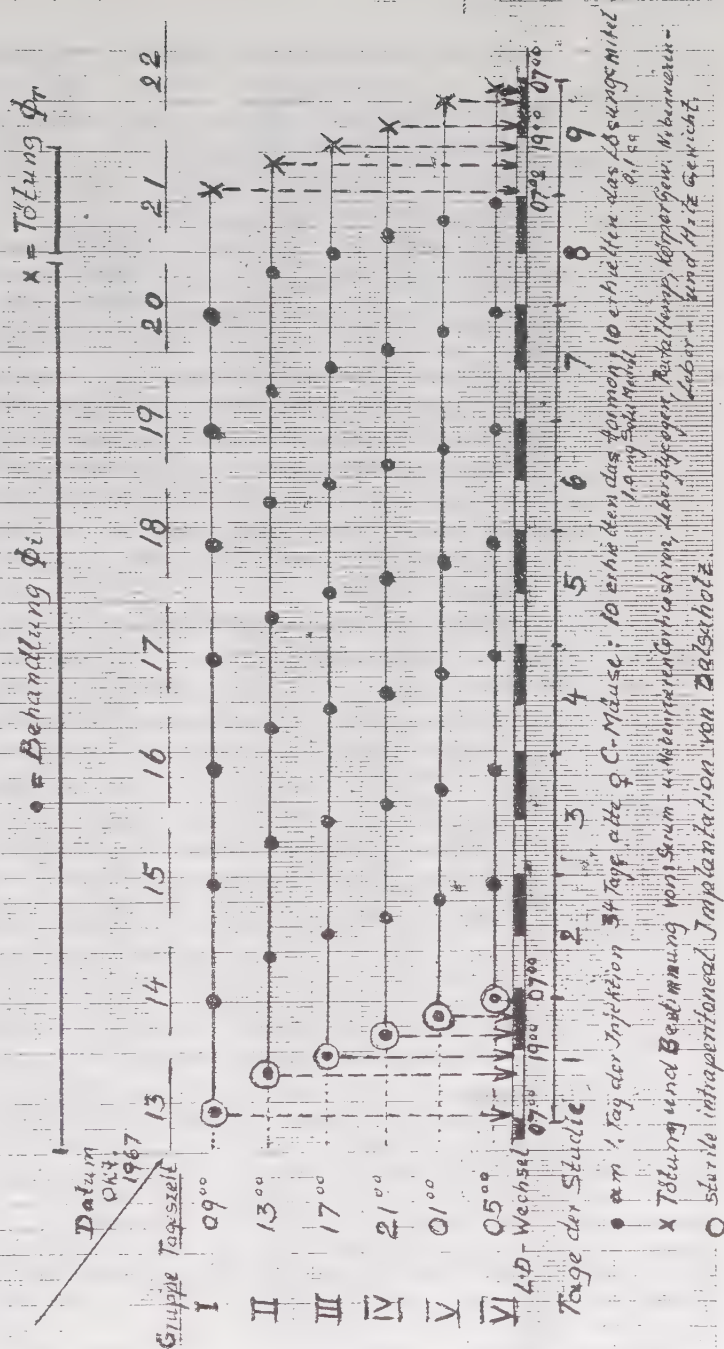
Gruppen:

LD-Synchronisator

19⁰⁰

05⁰⁰ Uhrzt.
 $\Phi:R_x/L$

Schema der täglichen Einzeldosen Solu-Medrol® Injektion



leicht von Granulomgewebe umgeben und ebenfalls nur gering mit den Eingeweiden verklebt. In einzelnen Fällen war das Holzstückchen nicht verklebt, sondern frei beweglich. Unterschiede in der Hemmwirkung der Steroide auf die Granulombildung konnten mit dem bloßen Auge nicht entdeckt werden.

Die bei der Operation entfernten Balsaholzstückchen wurden unmittelbar in phosphatgepuffertem Formalin fixiert. Angefertigte histologische Schnitte wurden gefärbt und eingebettet und müssen noch ausgewertet werden. Zur Klärung der Frage einer Zu- oder Abnahme der Granulom-Hemmwirkung bei den verschiedenen Corticosteroid-injizierten-Gruppen muß noch eine Methode entwickelt werden, um die Dicke der Granulomgewebszellschicht, die das Holzstückchen umgibt, zu messen und die Länge oder Fläche des in die Lamellen des Holzes infiltrierte Gewebes zu bestimmen.

Nach Beendigung dieser vorbeschriebenen Arbeit zu den einzelnen Zeitpunkten wurde das Blut 2mal bei einer Geschwindigkeit von 13.000rpm (Upm) zentrifugiert. Das Serum wurde bei -20°C eingefroren.

Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen:

In einer ersten Vorstudie gelang es, in weiblichen C-Mäusen durch i.p. implantiertes Balsaholz ein steriles Granulom zu erzeugen. Dieses Verfahren erlaubte im Gegensatz zu den übrigen Methoden eine gute Quantifizierung der Stärke der entzündlichen Infiltration. Als Maß kann die Strecke der Infiltration in das Röhrensystem des Balsaholzes mikroskopisch ermittelt werden.

Da das Verfahren der Auswertung der histologischen Schnitte noch entwickelt werden muß, können die Ergebnisse der Untersuchung nicht mehr in diese Arbeit aufgenommen werden.

Eine zweite Vorstudie ließ in einem Dosis-Wirkungs-Versuch (DWS) erkennen, daß Solu Medrol, ein Natrium Succinatester von Methylprednisolon (allgemein als anti-entzündliches synthetisches Corticosteroid mit geringem Einfluß auf Wasser- und Mineralstoffwechsel verwendet), in einer Tagesdosis von 1 mg pro 10g Körpergewicht des Versuchstiers, bei noch nicht geschlechtsreifen weiblichen Mäusen das Wachstum deutlich hemmt. Die Ergebnisse der Einwirkung verschiedener Dosen Methylprednisolon auf den Mäuseorganismus -Körpergewichtsänderung, Rektaltemperaturänderung sowie Änderung von Organgewichten (Leber, Milz, Nebenniere)- werden im einzelnen ausführlich erörtert.

In einer Hauptstudie konnte gezeigt werden, daß jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe die gleichen Mengen von Methylprednisolon zu verschiedener Tageszeit, respektive in verschiedenen Zuständen der Circadian-System-Phasen appliziert, auf verschiedene Körperfunktionen unterschiedliche Wirkung hatten.

Ergebnisse der Vorstudie:

Ziel der Vorstudie war es, im Hinblick auf die Circadian-System-Phasen bezogene Cortison-Empfindlichkeits-Studie im Hauptversuch, eine Dosis zu finden, bei der die Wirkung des Cortison in einer deutlichen Körpergewichtsreduktion zum Ausdruck kommt.

Körpergewicht

Wie aus Abb. 13 und Abb. 14 ersichtlich wird, trat im Verlauf einer Circadian-System-Phasen * bezogenen 8tägigen "Einzelgaben"**-Injektion von unterschiedlichen Dosen (0.1 μ g bis 10 mg) Solu Medrol gegenüber der Kontrollgruppe, die lediglich 0.1 cc Lösungsmittel erhalten hatte, eine zunehmende Körpergewichtsreduktion auf. Am ausgeprägtesten wird dies aus der Abb. 14 für die Dosis 1 mg und 10 mg ersichtlich.

Für weitere Untersuchungen in der Hauptstudie wurde die 1 mg Dosis gewählt, da die 10 mg/10 mg Körpergewicht Dosis zu hoch erschien; eines der Tiere, die diese Dosis erhalten hatten, war innerhalb einer Woche nach Injektion gestorben.

* Als Zeitpunkt täglicher Injektion wurde $17^{00} \pm 30$ Min. gewählt, da bei der Maus um diese Zeit die höchste Serum-Corticosteron-Konzentration zu erwarten ist.

** Der Ausdruck "Einzelgabe" weist auf eine Applikationsart hin, bei der eine gewählte Dosis in gesammelter Menge zu einem Zeitpunkt gegeben wird. Im Gegensatz dazu kann die gesamte Dosis in 2 oder mehr Teildosen aufgeteilt werden, die dann über eine 24-h-Periode zu verschiedenen Uhrzeiten appliziert wird (Scalabrino et al., 137; Nugent et al., 138).

Organgewichts-Mittelwerte (Leber, Milz, Nebenniere) sind mit Standardabweichung (SD) für 6 Versuchsgruppen, die über 8 Tage mit unterschiedlichen Dosen Solu Medrol bei täglicher "Einzelgaben"-Injektion behandelt wurden, in Tab. 7 zusammengefaßt und in Abb. 15 mit Standardfehlern graphisch dargestellt.

Eine Kontrollvergleichsgruppe, bei der täglich nur Lösungsmittel injiziert wurde, diente in ihren Gruppenwerten als Referenz.

Die zur Circadian-System-Phase bezogene Injektion von Cortison mit aufsteigender Dosis zeigte nach 8 Tagen der Studie unterschiedliche Reaktionsabläufe der einzelnen Organe. Zu einer eindeutig drastischen Reduktion des Milzgewichtes führte die Dosis 1 mg und noch stärker die Dosis 10 mg pro 10g Körpergewicht. Die Dosen 0.1 g bis 1 mg führten zu keiner wesentlichen Änderung der Nebennieren-Gruppenwerte. Dieses Phänomen kann wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Circadian-System-Phasen bezogenen Steroidapplikation gesehen werden, die zu einem Zeitpunkt der für die Maus höchstem Serum-Corticosteron-Konzentration erfolgte. Lediglich die 10 mg Dosis führte zu einer erheblichen Gewichtsreduktion. Das Lebergewicht wurde bis zur Dosis 1 mg Solu Medrol für die einzelnen Gruppen nicht wesentlich verändert. Die 10 mg Dosis jedoch zeigte einen exzessiven Anstieg.

Rektal-Temperatur

Trägt man die in Tab. 8 zusammengestellten Rektal-Temperatur-Mittelwerte, die bei den verschiedenen Versuchs- und Kontrollgruppen im 4-h-Intervall über 24 h ermittelt wurden, graphisch auf (Abb. 16), so erkennt man makroskopisch unschwer einen sinusförmigen Verlauf der Kurven. Ein mikroskopisches Analyseverfahren,

wie es durch die Methode der Kleinst-Quadrat-Spektren gegeben ist, konnte sowohl für die Rektal-Temperatur der Kontrollgruppe als auch für die Gruppen mit unterschiedlichen Corticosteroid-Dosen eindeutig ein circadianer Rhythmus festgestellt werden (Tab. 12).

Durch das im Kapitel "statistische und mathematische Methoden" beschriebene Cosinor-Verfahren wurden für die Kontrollgruppe A, die 1 mg-Dosis, Gruppe B und die 10 mg-Dosis-Gruppe C im Einheitskreis von 360° , Fehler-ellipsen gezeichnet. In dieser Darstellung wird klar demonstriert, daß durch Nichtüberlappen der Ellipsen für alle 3 Gruppen ein circadianer Rhythmus bestätigt wird. Weiter ersieht man daraus, daß die Acrophasen der Kontrollgruppe wie auch der 1 mg-Dosis-Gruppe bei -339° und -343° eng zusammenliegen. Die Acrophase der 10 mg-Dosis liegt bei -138° und weist somit gegenüber den vorgenannten eine signifikante Phasenverschiebung von mehr als 90° auf (Abb. 21).

Ergebnisse der Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie (SES):

Auf Grund der Ergebnisse der Voruntersuchungen wurde für die Cortison-Empfindlichkeits-Studie die 1 mg/10g Körpergewichts-Dosis gewählt. Genetisch vergleichbare Inzucht-C-Mäuse, für die eine Licht-Dunkel-Synchronisation von L: 07.00 bis 19.00 gewählt wurde, waren gruppenweise in Kontroll- und Versuchstiere aufgeteilt. Wie aus Abb. 20 ersichtlich ist, erhielten 6 Gruppen zu 6 verschiedenen Circadian-System-Phasen bezogenen Zeiten täglich über einen Zeitraum von 8 Tagen eine für das Körpergewicht festgesetzte Cortison-Dosis. Diesen Gruppen gegenüber standen 6 weitere Gruppen, die zur gleichen Zeit parallel Lösungsmittel injiziert bekamen.

COSINOR-ERGEBNISSE DER DOSIS-WIRKUNGS-STUDIE (DWS)

Circadian-Acrophasen der Rektaltemperatur verschiedener Gruppen von ♀ C-Mäusen, behandelt mit unterschiedlichen Dosen Corticosteroid R_x (1).

Grp.Nr.	Cortison-Dosen R_x	P Statist. Sicherung	Amplituden C Niveau(2)°	Acrophase Grade °	φ (3)	hr
(95 % Vertrauensbogen)						
I (4)	0.0	.001	37.17 (37.08 bis 37.26)	-339° (-332° bis -346°)	22.37	(21.40 - 23.33)
II	0.0001	.001	36.83 (36.71 bis 36.95)	-346° (-336° bis -356°)	23.08	(21.49 - 0.27)
III	0.001	.001	37.21 (37.11 bis 37.31)	-340° (-331° bis -349°)	22.40	(21.26 - 23.54)
IV	0.01	.001	37.02 (36.93 bis 37.11)	-344° (-336° bis -352°)	22.59	(21.56 - 0.03)
V	0.1	.025	37.08 (36.94 bis 37.22)	- 8° (-341° bis - 27°)	0.35	(22.06 - 3.04)
VI	1.0	.001	37.19 (37.09 bis 37.29)	-343° (-331° bis -355°)	22.55	(21.13 - 0.36)
VII	10.0	.009	37.27 (37.05 bis 37.49)	-138° (-122° bis -154°)	9.13	(7.02 - 11.25)

1) R_x mg Solu Medrol (Methylprednisolon) über 8 Tage tgl. Injektion 17⁰⁰ ± 30 Min.

2) Gemessen in °Celsius

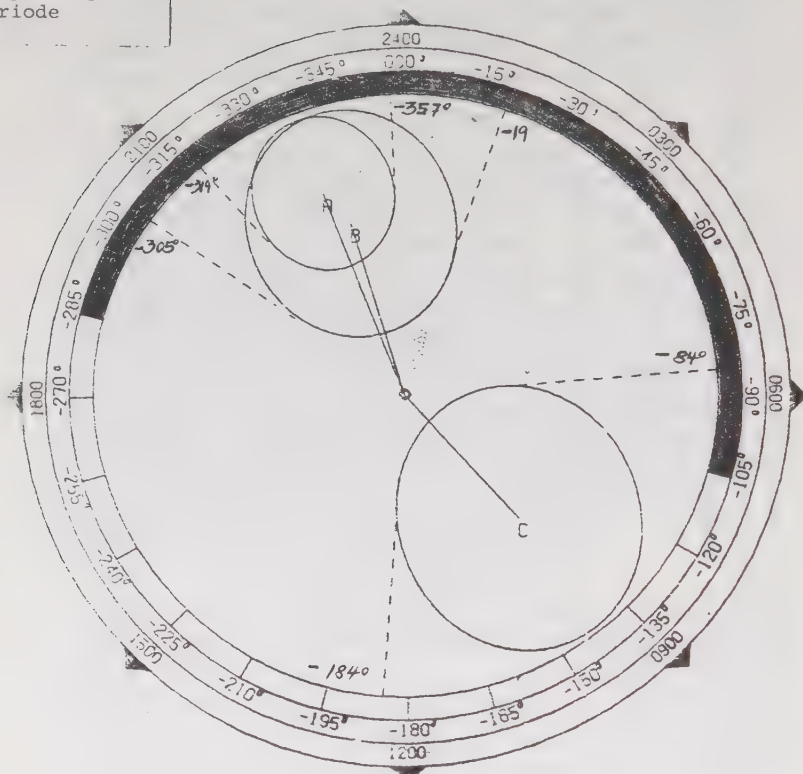
3) φ bezogen auf Mitte der Dunkel-D-Spanne, D: 19⁰⁰ - 07⁰⁰; Minuszeichen vor Graden = Verzögerung vom Mittelpunkt der täglichen Dunkelperiode

4) Kontrollen erhielten 0.1 cc Lösungsmittel; gleiches Injektionsschema wie 1).

Abb. 21

Dosis-Wirkungs-Studie

Chronogramm: Rektaltemperatur-Rhythmus

Kurvenanpassung an
24-h-Periode

Circadiane Acrophasenverschiebung des Rektaltemperatur-rhythmus bei Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener "Einzelgaben"-Injektion von verschiedenen Dosen Solu Medrol (B = 1 mg und C = 10 mg) sowie Lösungsmittel ohne Steroide (A = 0.1 cc). ($17^{00} \pm 30 \text{ Min.}$)

Sicherung des Rhythmus durch Cosinor-Verfahren.

$P_A < .001$	95 % Vertrauensbereich	für C_A : 0.68 bis 1.42
$P_B < .001$	95 % "	" für C_B : 0.22 bis 1.01
$P_C < .01$	95 % "	" für C_C : 0.24 bis 1.87

Der Planung dieser Versuchsanordnung ging die Überlegung voraus, inwieweit zu dem bestehenden Licht-Dunkel-Synchronisator, Cortison ein durch die Applikationszeit bedingtes synchronisierendes oder desynchronisierendes Prinzip darstellt.

Die Tötungszeiten wurden so festgelegt, daß erst 24 h nach der letzten Lösungsmittel- oder Wirkstoffapplikation die Dekapitation für die einzelne Gruppe vorgenommen wurde. Der Grund dieses Vorgehens lag einmal darin, daß die ad hoc Wirkung der verabreichten Cortison-Menge von der Analyse ausgeschlossen war und daß außerdem die für die Applikation festgelegte Circadian-System-Phase auch beim Töten für die einzelnen Gruppen eingehalten wurde. Eine für alle Gruppen zur gleichen Uhrzeit einheitlich festgesetzte Dekapitationszeit wäre dem circadianen System nicht gerecht geworden, da jede einzelne Gruppe unterschiedlich zu einer anderen Circadian-System-Phasen bezogenen Zeit injiziert, und darauf bezogen auch getötet worden wäre.

Freilich blieb nicht außer acht, daß zum Zeitpunkt des Tötens für die einzelnen Parameter verschiedener Medikationsgruppen nur eine Phase getroffen wurde. Da die Gruppen untereinander aber genetisch vergleichbar waren, konnte die Wirkung der Medikation im einzelnen Circadian-System-Phasen bezogenen Punkt mit den anderen Werten verglichen und diskutiert werden.

Erläuterung der einzelnen Ergebnisse:

Zur Kontrolle der Gruppen mit vergleichbaren Ausgangskörpergewichten wurde 8 Tage vor Beginn der Cortison-Empfindlichkeits-Studie (4.Okt.) eine einmalige Gewichtsmessung vorgenommen (17 ± 30 Min.).⁸

In Tab. 9 sind die Mittelwerte zusammengefaßt und in Abb. 17 graphisch dargestellt. Der Kurvenverlauf zeigt eine etwa gleiche Ausgangsposition für beide Kontroll- und Versuchsgruppen.

8 Tage nach Beginn der Cortisonapplikation -s.Tab. 13 und Abb. 19- zeigt die Kontrollgruppe im Verlauf einer Woche bei makroskopischer Inspektion zu verschiedenen Zeiten eine deutliche Gewichtszunahme, wobei allerdings für die Zeit um 21.00 und 05.00 keine Zunahme erkannt wurde. Im Vergleich zu diesen eben genannten Kurven und gegenüber dem Beginn der Studie stand bei den verschiedenen Cortison-behandelten Versuchsgruppen eine deutliche Gewichtszunahmeverminderung. Die Gewichtszunahmeneinschränkung zum Zeitpunkt des erwarteten höchsten Circadian-System-Phasen bezogenen Serumcorticosteronspiegels war am geringsten.

Eine Analyse nach der Methode der Kleinst-Quadrat-Spektren (Tab. 14) hatte weder für das Körpergewicht der Kontrollgruppe noch für das der Cortison-Gruppen einen Circadian-Rhythmus entdeckt. $P > 0.5$.

Die Fehlerellipse überlappte den Ursprung der Zeigerdarstellung.

Rektal-Temperatur

Die Gruppen-Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD) der Rektaltemperatur zeigen (Tab. 15, 16) für Kontroll- und Versuchsgruppen zwischen Beginn und Ende der Studie keinen (Abb. 22)

SOLU-MEDROL-EMPFFINDLICHKEITS-STUDIE

KÖRPERGEWICHT

9 Tage nach Beginn der Studie unmittelbar vor Dekapitation ϕ_T der Tiere = zu den verschiedenen Circadian-System-Phasen bezogenen Injektionszeiten ($\phi_{IX/L}$) *

G r u p p e n (10 ♀ Bagg Albino C-Mäuse) pro Gruppe	21./22. Oktober 1967											
	Uhrzeit											
	09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	01 ⁰⁰	05 ⁰⁰						
Versuchs-Gruppen	Mittelwert (g) ± Standardabweichung SD											
	X	±SD	X	±SD	X	±SD	X	±SD	X	±SD		
	13.3	1.8	13.8	2.3	14.4	2.0	14.1	1.6	14.5	1.4	13.8	2.8
Kontroll-Gruppen				**				***				
	15.2	1.9	15.5	1.3	13.6	3.1	15.5	1.3	14.9	1.8	14.3	3.2
								**				

* ϕ_{IX} = ϕ_T = Phasen der 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon) i.p.-Injektion bei Versuchstieren
 ϕ_{IL} = ϕ_T = Phasen der 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide) i.p.-Injektion bei Kontrolltieren
 ϕ_T z.ztpkt. $\phi_{IX/L}$ ohne unmittelbar vorausgehender Injektion

JD : (L : 07⁰⁰ - 19⁰⁰; D : 19⁰⁰ - 07⁰⁰)

** 9 Mäuse in der Gruppe
 *** 8 Mäuse in der Gruppe

COSINOR-ERGEBNISSE DER SOLU-MEDROL-R_x-EMPFINDLICHKEITS-STUDIE (SES).

Circadian-Acrophasen verschiedener Körperfunktionen bei Kontroll-(C) und Versuchsgruppen(E) von weiblichen C-Mäusen, behandelt zu unterschiedlichen Circadian-Phasen (ϕ_1) mit gleichen Dosen Corticosteroid R_x (2) oder Lösungsmittel (3).

Dat. Okt.	Variable Gruppe: Körperfunktion	P Statist. Sicherung	Amplituden ^o Niveau	Acrophase Grade ^o	Acrophase hr (4)
95 % Vertrauensbogen					
13.	C:Körp.Gew.	.05	-	- 71 ^o (-27 ^o bis -115 ^o)	-
	E:Körp.Gew.	.05	-	- 3 ^o (-304 ^o bis - 62 ^o)	
13.	C:Rekt.Temp.	.05	-	-268 ^o (-244 ^o bis -292 ^o)	
	E:Rekt.Temp.	.025	36.86 (36.78 bis 37.04)	-326 ^o (-306 ^o bis -346 ^o)	21 ⁴⁷ (19 ⁰⁶ bis 0 ²⁹)
20.	C:Körp.Gew.	.05	-	-118 ^o (-244 ^o bis -352 ^o)	
	E:Körp.Gew.	.05	-	-312 ^o (-245 ^o bis - 19 ^o)	
21.	C:Körp.Gew.	.05	-	-129 ^o (-327 ^o bis -291 ^o)	
	E:Körp.Gew.	.05	-	-318 ^o (-279 ^o bis -357 ^o)	
21.	C:Rekt.Temp.	.025	36.71 (36.59 bis 36.83)	-336 ^o (-314 ^o bis -358 ^o)	22 ²⁶ (19 ³⁰ bis 1 ²²)
	E:Rekt.Temp.	.05	-	-261 ^o (-213 ^o bis -309 ^o)	
21.	C:LeberGew.	.004	835.52 (814.44 bis 856.60)	-107 ^o (- 91 ^o bis -123 ^o)	7 ¹⁰ (5 ⁰⁴ bis 9 ¹⁸)
	E:LeberGew.	.05	-	- 34 ^o (- 5 ^o bis - 63 ^o)	
21.	C:NebennierenGew.	.05	-	- 94 ^o (-321 ^o bis -227 ^o)	
	E:NebennierenGew.	.05	-	-257 ^o (-187 ^o bis -327 ^o)	
21.	C:Milz Gew.	.025	95.86 (91.92 bis 99.80)	- 93 ^o (- 73 ^o bis -113 ^o)	6 ¹⁵ (3 ³⁵ bis 8 ⁵⁵)
	E:Milz Gew.	.019	54.82 (52.64 bis 57.00)	-333 ^o (-314 ^o bis -352 ^o)	22 ¹³ (19 ⁴⁴ bis 0 ⁴²)
21.	C:LeberglycogenGeh.	.001	2.56 (2.41 bis 2.71)	- 90 ^o (- 83 ^o bis - 97 ^o)	6 ⁰⁴ (5 ⁰⁶ bis 7 ⁰²)
	E:LeberglycogenGeh.	.001	1.68 (1.53 bis 1.83)	- 71 ^o (- 58 ^o bis - 84 ^o)	4 ⁴⁵ (3 ⁰³ bis 6 ²⁷)

1) ϕ_1 = 9 Tage "Einzelgaben"-Injektion von R_x, tägl. (09⁰⁰, 13⁰⁰, 17⁰⁰, 21⁰⁰, 01⁰⁰, 05⁰⁰).

2) 1 mg Solu-Medrol (Methylprednisolon) i.p.-Injektion zum Zeitpunkt ϕ_1 .

3) 0.1 cc Lösungsmittel i.p.-Injektion zum Zeitpunkt ϕ_1 .

4) ϕ bezogen auf Mitte der Dunkelperiode D: 19⁰⁰ bis 07⁰⁰;

Minuszeichen vor Graden = Verzögerung vom Mittelpunkt der täglichen Dunkelperiode.

SOLU-MEDROL-EMPFFINDLICHKEITS-STUDIE

Rektaltemperatur

Bei Beginn der Studie zu verschiedenen Circadian-System-Phasen bezogenen Injektions-
zeiten ($\phi_{iR_x/L}$) *

Gruppen (10 ♂ Bagg Albino C-Mäuse) pro Gruppe		13./14. Oktober 1967							
		Uhrzeit							
		09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	01 ⁰⁰	05 ⁰⁰		
Mittelwert (°C) ± Standardabweichung SD									
X	±SD	X	±SD	X	±SD	X	±SD	X	±SD
36.7	0.6	36.4	0.4	36.5	0.5	38.3	0.5	37.3	0.4
			**				***		
36.7	0.6	36.6	0.3	36.6	0.9	38.4	0.3	36.8	1.4
							**		

* ϕ_{iR_x} = Phasen der 1 mg Solu-Medrol (Methylprednisolon) i.p.-Injektion bei Versuchstieren
 ϕ_{iL} = Phasen der 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide) i.p.-Injektion bei Kontrolltieren

9 Mäuse in der Gruppe

8 Mäuse in der Gruppe

**

SOLU-MEDROL-EMPFINDLICHKEITS-STUDIE

REKTALTEMPERATUR

9 Tage nach Beginn der Studie unmittelbar vor Dekapitation ϕ_T der Tiere = zu den verschiedenen Circadian-System-Phasen bezogenen Injektionszeiten ($\phi_{1X/L}$) *

* ϕ_{1R} = ϕ_T = Phasen der 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon) i.p.-Injektion bei Versuchstieren
 ϕ_{1X} = ϕ_T = Phasen der 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide) i.p.-Injektion bei Kontrolltieren
 ϕ_{1L} = z.Ztpkt. $\phi_{1R}/\phi_{1X}/\phi_{1L}$ ohne unmittelbar vorausgehende Injektion.
 ϕ_T (L: 0700 - 1900; X: 1900 - 0700)

** 9 Mäuse in der Gruppe

*** 8 Mäuse in der Gruppe

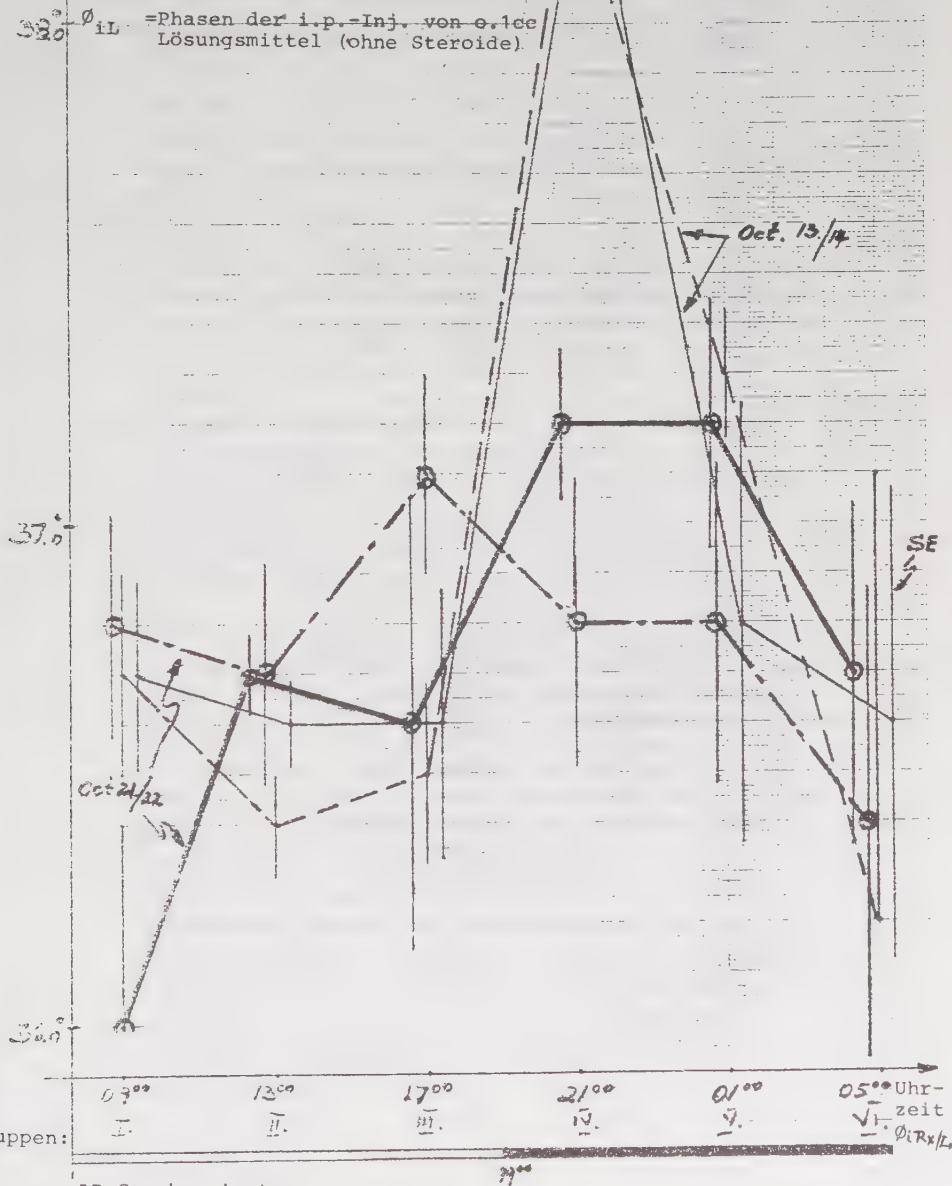
21./22. Oktober 1967											
Uhrzeit											
		09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	01 ⁰⁰	05 ⁰⁰				
Mittelwert (°C) ± Standardabweichung SD											
G r u p p e n	(10 ♀ Bagg Albino C-Mäuse) pro Gruppe	X	±SD,	X	±SD	X	±SD	X	±SD	X	±SD
Versuchs-Gruppen		36.8	0.7	36.7	0.7	37.1	0.6	36.8	0.8	36.8	1.0

Kontroll-Gruppen		36.0	1.3	36.7	0.3	36.6	1.4	37.2	0.5	36.7	1.1
		**									

Zwischen den Kontrollen (ϕ_L) und den mit SoluMedrol^R Circadian-System-Phasen bezogen $\times$ behandelten Versuchsguppen zeigt sich nach 9 Tagen kein signifikanter Unterschied.

ϕ_{iR} = Phasen der i.p.-Inj. von 1 mg SoluMedrol (Methylprednisolon)

ϕ_{iL} = Phasen der i.p.-Inj. von 0.1cc Lösungsmittel (ohne Steroide)



signifikanten Unterschied. Werte der Acrophase sind in der Tab. 14 gegenübergestellt. Die statistische Sicherung war bei $P > .025$ und $P > .05$ nicht signifikant. Eine Aussage über den Effekt der täglichen Corticosteroid-Injektion zu verschiedenen Circadian-System-Phasen bezogenen Zeiten konnte bei diesen Parametern nicht gemacht werden.

Organgewichte (Leber, Milz, Nebenniere)

1. Lebergewicht

Die Kurve (Abb. 23) der Lebergewichtsmittelwerte $\pm$ SE (Tab. 17) zeigt für die Kontrollgruppe eine Sinusform. Im Vergleich dazu läßt die Kurve der Versuchsgruppen lediglich zum Zeitpunkt der 09.⁰⁰- und 13.⁰⁰-Applikation einen signifikanten Unterschied erkennen.

Ergebnisse der Cosinor-Auswertung (Tab. 14) dokumentieren einen Circadian-Rhythmus für die über einen Zeitraum von 24 h ermittelten Lebergewichtswerte vergleichbarer Kontrollgruppen. $P < .01$.

In einem Chronogramm (Abb. 24) ist die Acrophase des Lebergewichtes der Kontrollgruppen bei -107° mit 95%igem Vertrauensbogen von -62° bis -152° dargestellt und durch das Nichtüberlappen des Ursprungs der Zeigerdarstellung durch die Fehlerellipse ein Circadian-Rhythmus nachgewiesen.

Was bei makroskopischer Inspektion der durch Mittelwerte erhaltenen Kurve (Abb. 23) nicht eindeutig feststellbar war, konnte durch "mikroskopische Analyse" der Lebergewichtsdaten von Cortison-behandelten Versuchsgruppen gezeigt werden. Bei $P > .05$ ist, wie im Chronogramm (Abb. 24) durch Überlappen des Ursprungs der gezeichneten Fehlerellipse gezeigt wird, ein Circadian-Rhythmus nicht nachweisbar.

Da nach den Methoden der Rhythmometrie kein Circadian-Rhythmus für die Lebergewichtsmittelwerte der verschiedenen Injektionszeiten gefunden wurde, sind signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Kontroll- und Versuchsgruppen (Abb. 23) für die Zeiten 09.⁰⁰ und 13.⁰⁰ als zufällig, aber nicht rhythmisch, zu werten.

Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie

Lebergewicht

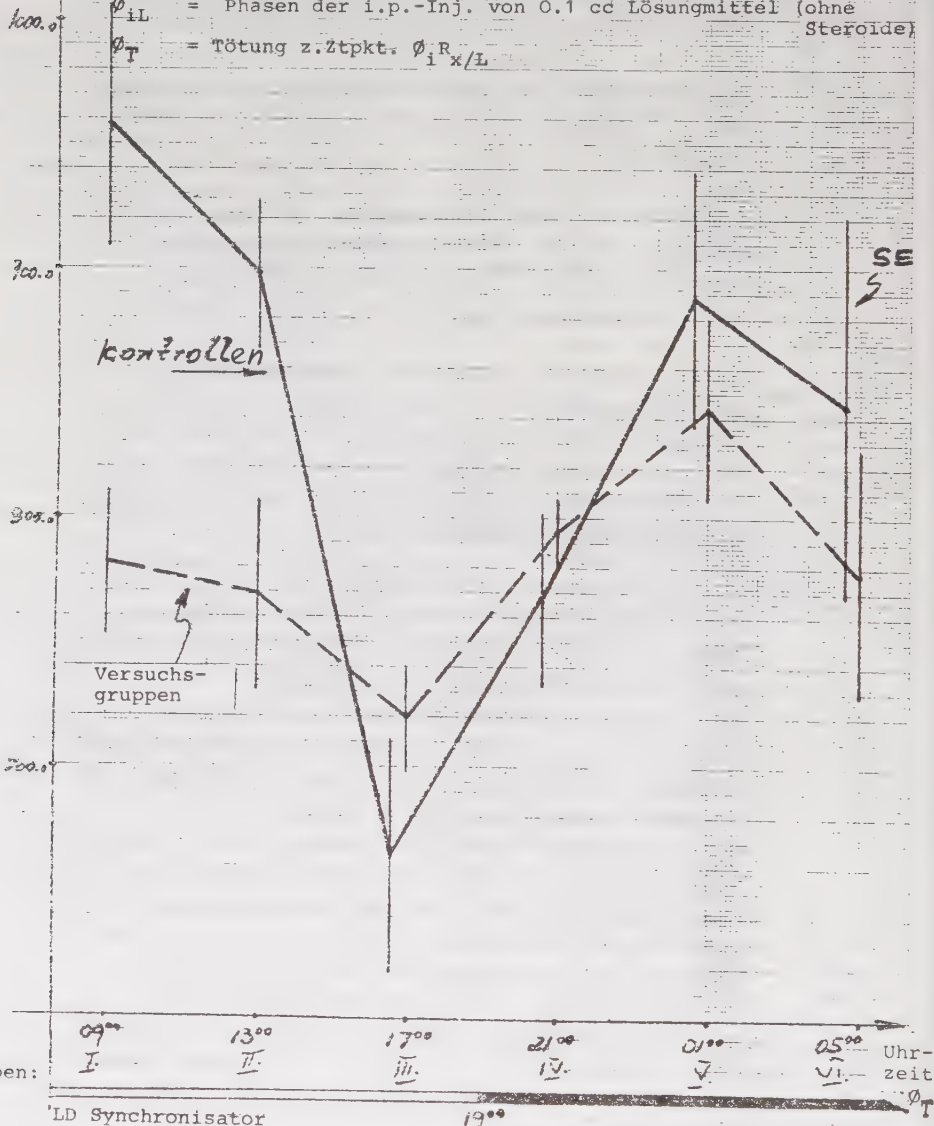
Lebergewichtsveränderung zwischen Kontroll- und Versuchstieren nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol- (ϕ_{iR_x}) oder Lösungsmittelapplikation (ϕ_{iL}).

Nur bei 2 Gruppen (09⁰⁰ bis 13 Uhr) zeigt sich ein Wirkungsunterschied der Cortison-Behandlung.

ϕ_{iR_x} = Phasen der i.p.-Inj. von 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon)

ϕ_{iL} = Phasen der i.p.-Inj. von 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide)

ϕ_T = Tötung z.Ztpkt. ϕ_{iR_x}/L



SOLU-MEDROL-EMPFINDLICHKEITS-STUDIE

LEBER-GEWICHT

gemessen nach Dekapitation ϕ_T der Tiere = zu den verschiedenen Circadian-System-Phasen bezogenen Injektionszeiten ($\phi_{1R_x/L}$) *

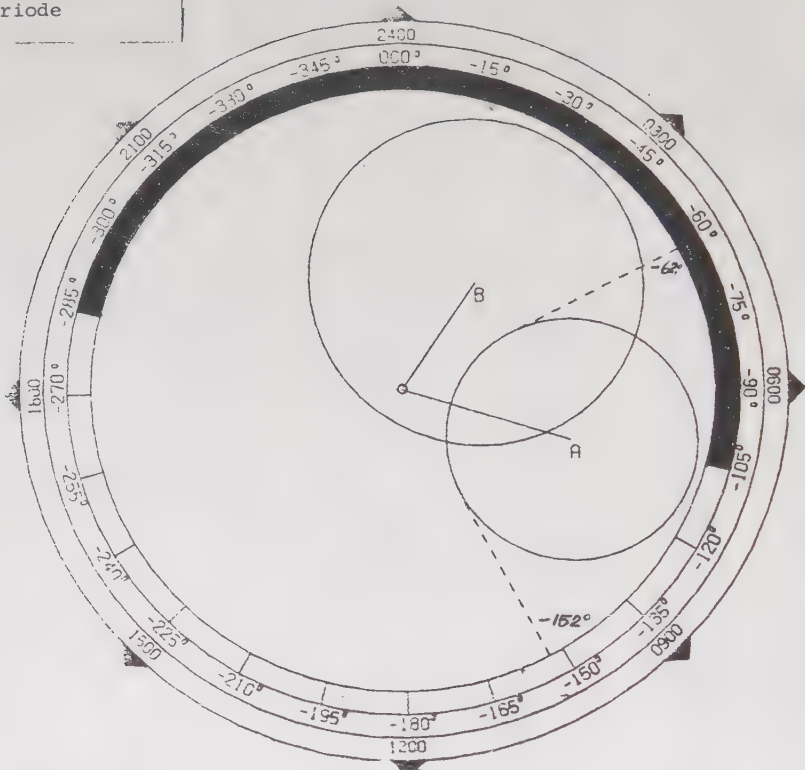
Gruppen (10 ♀ Bagg Albino C-Mäuse) pro Gruppe		21./22. Oktober 1967									
		Uhrzeit									
		09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	01 ⁰⁰	05 ⁰⁰				
Mittelwert (mg) ± Standardabweichung SD											
X	+SD	X	+SD	X	+SD	X	+SD	X	+SD	X	+SD
781.5	94.2	768.9	114.9	720.5	67.2	794.6	36.4	843.5	113.7	778.1	156.9
		**				***					
950.8	147.9	899.1	92.9	665.2	131.4	767.2	101.9	888.3	161.5	845.1	238.8
						**					

* ϕ_{iR_x} = ϕ_T = Phasen der 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon) i.p.-Injektion bei Versuchstieren
 ϕ_{iL} = ϕ_T = Phasen der 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide) i.p.-Injektion bei Kontrolltieren

** 9 Mäuse in der Gruppe ϕ_T = z.Ztpkt. $\phi_{iR_x/L}$ ohne unmittelbar vorausgehende Injektion
 *** 8 Mäuse in der Gruppe

Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie
Chronogramm: Lebergewichts-Rhythmus

Kurvenanpassung an
24 h-Periode



Circadiane Acrophase des Lebergewichts-Rhythmus bei Kontrolltieren (A) nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Behandlung mit Lösungsmittel ohne Steroide und Desynchronisation des Circadianrhythmus nach gleichem Behandlungsschema mit Solu Medrol (Methylprednisolon) bei Versuchsgruppen (B).

Sicherung der Rhythmus durch Cosinor-Verfahren.

$P_A < .01$ 95 % Vertrauensbereich für C_A : 30.80 bis 180.7

$P_B < .05$

2. Milzgewicht

Die Kurven (Abb. 25) der mittleren Milzgewichtswerte zeigen für Kontroll- und Versuchsgruppen (Tab. 18), ausgenommen die 21.⁰⁰-Gruppe, signifikante Gewichtsunterschiede. Wie in der Vorstudie (Abb. 15) demonstriert wurde, verursachte Cortison eine deutliche Milzgewichtsreduktion, die bei Circadian-System-Phasen bezogener Applikation am stärksten in der 09.⁰⁰-Gruppe ausgeprägt war. Eine Desynchronisation des circadianen Milzgewichts-Rhythmus trat durch Cortison nicht auf. Im Chronogramm (Abb. 26) wird zwischen der Kontrollgruppe A mit der Acrophase bei -93° und dem Vertrauensbogen von -30° bis -157° und der Versuchsgruppe B mit der Acrophase bei -133° und dem Vertrauensbogen zwischen -30° und -274° eine Phasenverschiebung deutlich.

Statistische Signifikanz für beide Gruppen: $P \leq .025$.

Diese Phasenverschiebung muß jedoch mit Einschränkung betrachtet werden, da die beiden Fehlerellipsen für Kontroll- und Cortison-behandelte Versuchsgruppen geringfügig überlappen.

3. Nebennierengewicht

Aus der Tab. 19 und der Abb. 27 geht hervor, daß die Gewichte der Nebennieren von Methylprednisolon-behandelten Mäusen, ausgenommen die der 21.⁰⁰-Medikationsgruppe, im Vergleich zu den Kontrolltieren leichter waren.

Ähnliche Ergebnisse lagen auch bei den Milzgewichten vor (Abb. 25).

Durch die Methode der Anpassung kleinster Quadrate konnte in den Zeitreihen der Nebennierengewichtsdaten

Zu Abb. 25

Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie Milzgewicht

Unterschiedlich starke Milzgewichtsreduktion zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol (ϕ_{iR_x})- oder Lösungsmittelapplikation (ϕ_{iL}). Geringste cortison-abhängige Wirkung in der 21-Uhr-Gruppe.

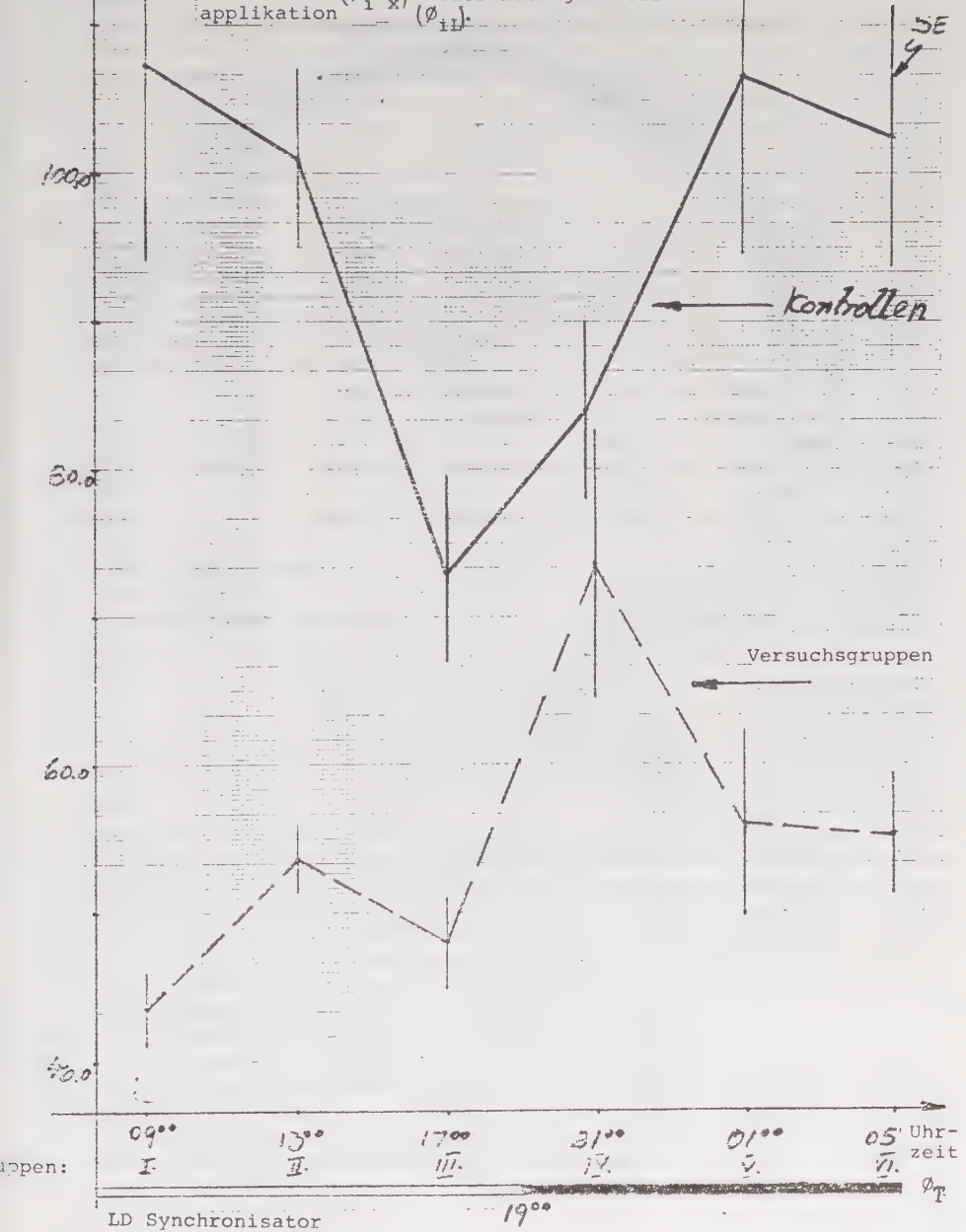
ϕ_{iR_x} = Phasen der i.p.-Injektion von 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon)

ϕ_{iL} = Phasen der i.p.-Injektion von 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide)

ϕ_T = Tötung zum Zeitpunkt $\phi_{iR_x/L}$

Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie
Milzgewicht

Unterschiedlich starke Milzgewichtsreduktion
zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen nach
8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener
Solu Medrol(ϕ_{RX})- oder Lösungsmittel-
applikation (ϕ_{IL}).



SOLU-MEDROL-EMPFLINDLICHKEITS-STUDIE

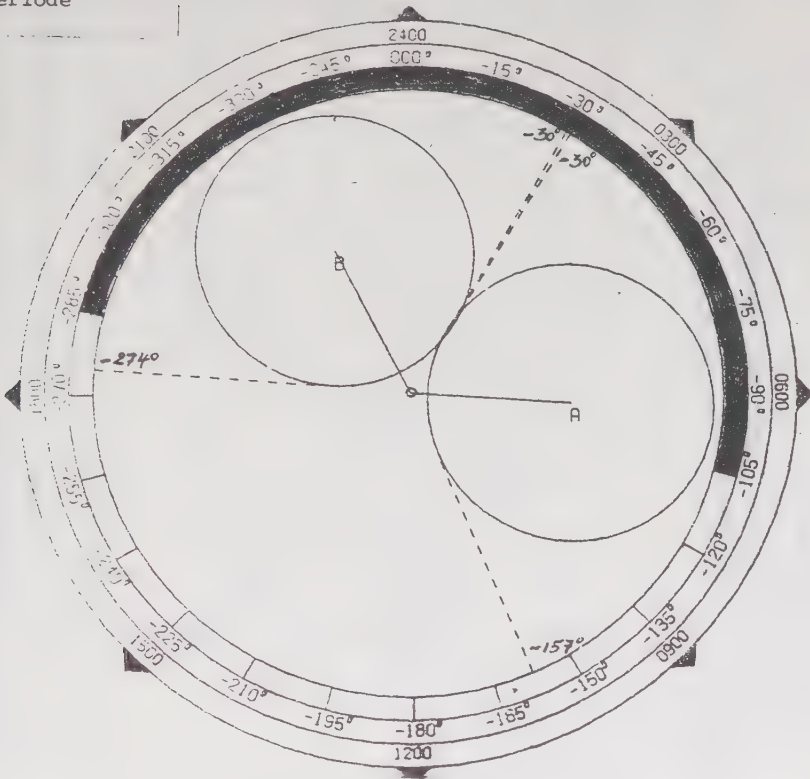
MILZ-GEWICHT

gemessen nach Dekapitation ϕ_T der Tiere = zu den verschiedenen Circadian-System-Phasen bezogenen Injektionszeiten ($\phi_{1R_X/L}$) *

		21./22. Oktober 1967					
		Uhrzeit					
		09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	01 ⁰⁰	05 ⁰⁰
		Mittelwert (mg) $\pm$ Standardabweichung SD					
	Gruppen (10 ♀ Bagg Albino C-Mäuse) pro Gruppe	X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD
		X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD	X	$\pm$ SD
Versuchs-Gruppen		43.8	7.7	53.5	7.6	48.8	9.7
					**		
Kontroll-Gruppen		107.5	41.2	101.0	20.7	73.0	21.3
					**		

Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie

Chronogramm; Milzgewichts-Rhythmus

rvenanpassung an
h-Periode

Circadiane Acrophasenverschiebung des Milzgewichtsrythmus bei Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Corticosteroid-Behandlung^(B) und bei Kontrolltieren mit Lösungsmittel ohne Steroidapplikation (A).

Sicherung des Rhythmus durch Cosinor-Verfahren.

P_A	.025	95 % Vertrauensbereich für C_A : 1.62 bis 29.70
P_B	.02	95 % Vertrauensbereich für C_B : 1.36 bis 16.97

SOLU-MEDROL-EMPFINDLICHKEITS-STUDIE

NEBENNIERENGEWICHT

gemessen nach Dekapitation ϕ_T der Tiere = zu den verschiedenen Circadian-System-Phasen bezogenen Injektionszeiten ($\phi_{iR_x/L}$) *

G r u p p e n (10 ♀ Bagg Albino C-Mäuse) pro Gruppe	2./22. Oktober 1967									
	Uhrzeit									
	09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	01 ⁰⁰	05 ⁰⁰				
	Mittelwert (mg) ± Standardabweichung SD									
Versuchs-Gruppen	X	±SD	X	±SD	X	±SD	X	±SD	X	±SD
	3.7	1.0	3.8	0.6	3.7	0.5	3.6	0.6	3.5	0.9
	***		**		***		***			
Kontroll-Gruppen	4.4	1.1	4.4	0.7	4.1	0.7	4.3	0.6	4.3	0.8
	***		***		***		***			

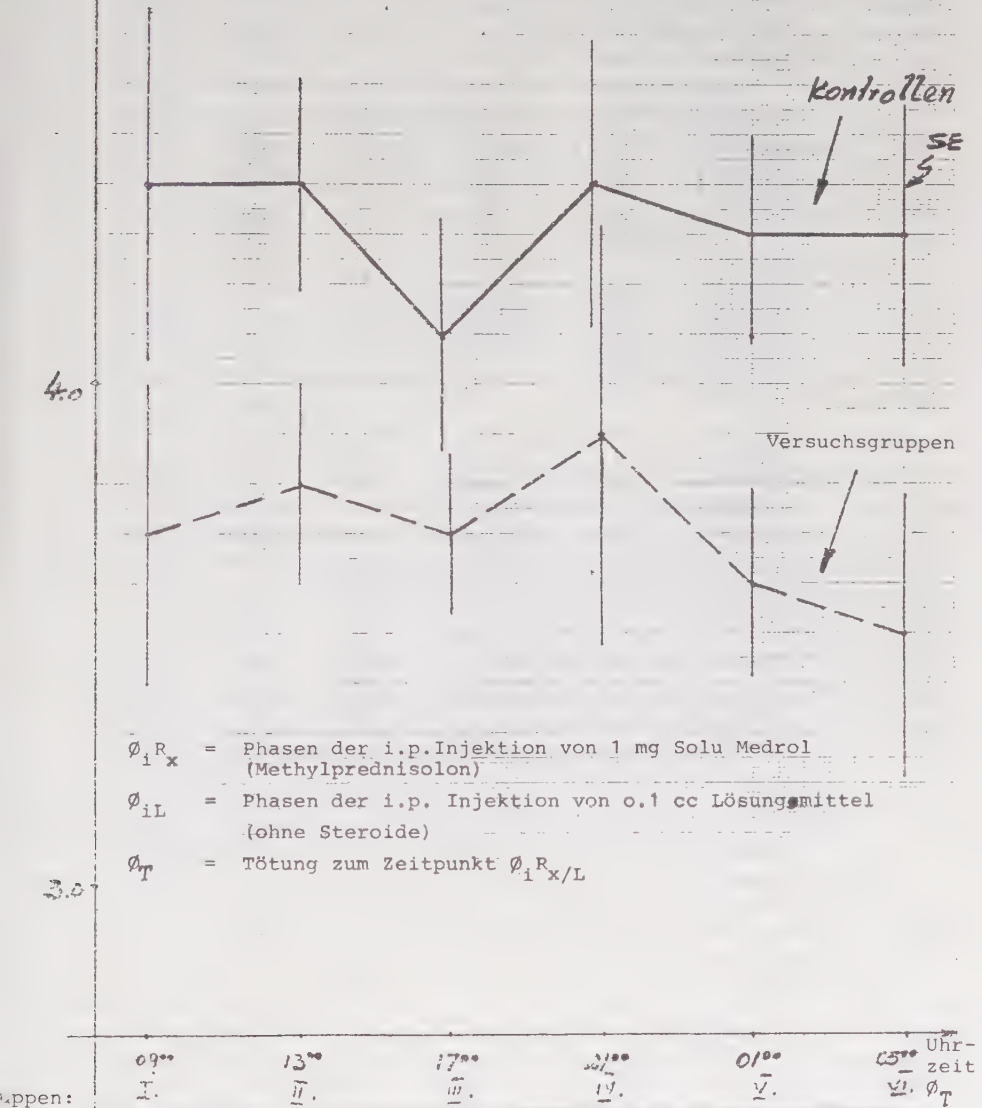
* ϕ_{iR_x} = ϕ_T = Phasen der 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon) i.p.-Injektion bei Versuchstieren
 ϕ_{iL} = ϕ_T = Phasen der 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide) i.p.-Injektion bei Kontrolltieren
 9 Mäuse in der Gruppe ϕ_T = z.zeitpunkt $\phi_{iR_x/L}$ ohne unmittelbar vorausgehende Injektion
 8 Mäuse in der Gruppe

**

Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie

Nebennierengewicht

Nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol (ϕ_{1R})-Behandlung zeigt sich gegenüber den Kontrollen (ϕ_{1L}) (nicht für x alle Gruppen) eine signifikante Nebennierensuppression.



für Kontroll- und Cortison-behandelte Versuchsgruppen keine circadiane Periodizität nachgewiesen werden (Tab. 14).

Statistische Signifikanz: $P > .05$.

Leber - Glycogen

Die nach der Methode von Good (135) erhaltenen Mittelwerte für Cortison-behandelte Versuchs- und Kontrollgruppen sind in Tab. 20 mit Standardabweichungen zusammengefaßt. Im Kurvenverlauf der Leberglycogen-Mittelwerte kann man lediglich bei den um 05.⁰⁰ und 09.⁰⁰ behandelten Versuchsgruppen, verglichen mit den Kontrolltieren, einen deutlichen Unterschied im Glycogen-Gehalt erkennen. Zu diesen Circadian-System-Phasen bezogenen Applikationszeiten war bei den Versuchstieren der Leberglycogen-Gehalt vermindert.

Eine Auswertung der Daten nach der Cosinor-Methode dokumentiert einen circadianen Rhythmus für den Leberglycogen-Gehalt der Kontrollgruppen mit der Acrophase -90° und einem Vertrauensbogen von -71° bis -110° (Tab. 14). Statistische Signifikanz: $P = .001$.

Dieser Nachweis eines Circadian-Rhythmus der Glycogen-Konzentration bei Kontrolltieren bestätigt Ergebnisse der Autoren (Potter, 139; Haus, 140; Halberg, 76; Sollberger, 141). Die höchste Leberglycogenspeicherung wird, wie aus dem Chronogramm (Abb. 28) für die Kontrollgruppe A zu ersehen ist, ungefähr um 06.⁰⁰ erreicht. Es ist anzunehmen, daß die rhythmische Änderung des Lebergewichts möglicherweise auch Vorgänge wiedergibt, die mit dem Circadian-Rhythmus des Leberglycogen-Gehalts verbunden sind. Vergleicht man die Chronogramme Abb. 24 und Abb. 28 wie auch Abb. 23 und Abb. 29, so wird für die Kontrollgruppe A diese Aussage deutlich. Die Vertrauensbereiche für Lebergewicht- und Leberglycogen-Acrophasen decken sich.

SOLU-MEDROL-EMPFINDLICHKEITS-STUDIE
LEBERGLYCOGEN

gemessen nach Dekapitation ϕ_T und Entfernung der Leber = zu den verschiedenen
Circadian-System-Phasen bezogenen Injektionszeiten ($\phi_{iX/L}$) *

**** 9 Mäuse in der Gruppe $\phi_T = z.$ Zeitpkt. $\phi_{iX/L}$ ohne unmittelbar vorausgehende Injektion.

Gruppen (10 ♀ Bagg AlbinoC-Mäuse) pro Gruppe	21./22. Oktober 1967											
	Uhrzeit											
	09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	01 ⁰⁰	05 ⁰⁰						
	Mittelwert (mg%) ± Standardabweichung SD											
	X	±SD	X	±SD	X	±SD	X	±SD	X	±SD	X	±SD
Versuchs-Gruppen	2.06	1.07	1.43	1.22	0.81	0.80	0.48	0.44	3.02	1.33	2.22	1.31
			***					***				
Kontroll-Gruppen	3.84	1.11	2.33	1.24	0.95	0.82	1.06	0.89	3.53	0.89	3.66	1.57
			****					****				****
											4.10	0.89

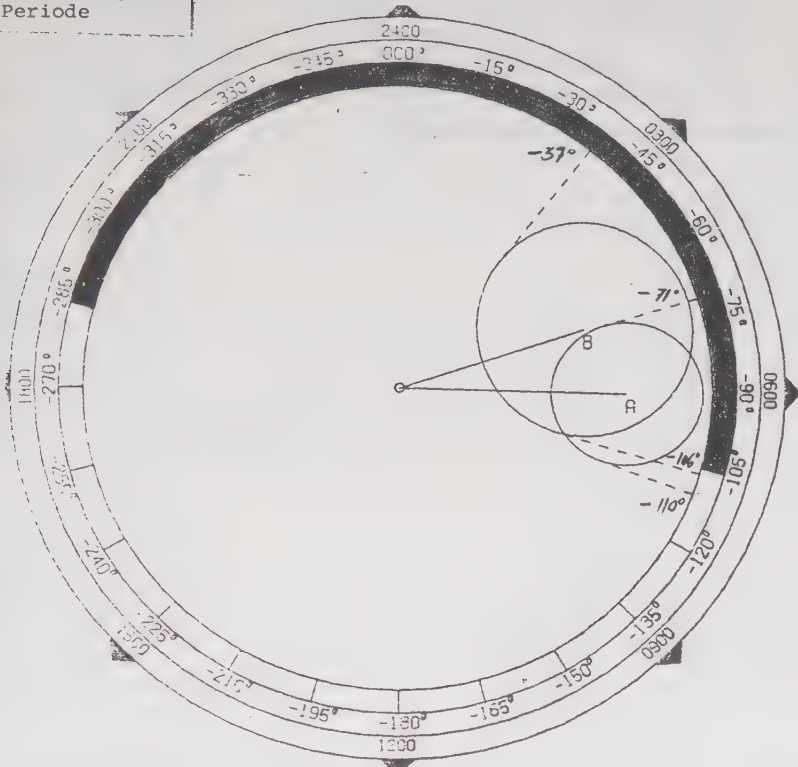
* $\phi_{iX} = \phi_T$ = Phasen der 1 mg Solu-Medrol (Methylprednisolon) i.p.-Injektion bei Versuchstieren
 $\phi_{iL} = \phi_T$ = Phasen der 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide) i.p.-Injektion bei Kontrolltieren
 bei Ausschluß des Wertes 0.11 **** 8 Mäuse in der Gruppe

**

Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie

Chronogramm: Leberglycogenkonzentration-Rhythmus

Kurvenanpassung an
24-h-Periode



Circadiane Acrophasenverschiebung des Leberglycogenkonzentrations-Rhythmus bei Mäusen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Corticosteroidbehandlung (B) und bei Kontrolltieren mit Lösungsmittel ohne Steroidapplikation (A)

Sicherung des Rhythmus durch Cosinorverfahren.

$P_A < .001$ 95 % Vertrauensbereich für C_A : 1.10 bis 2.19

$P_B < .001$ 95 % Vertrauensbereich für C_B : 0.43 bis 1.54

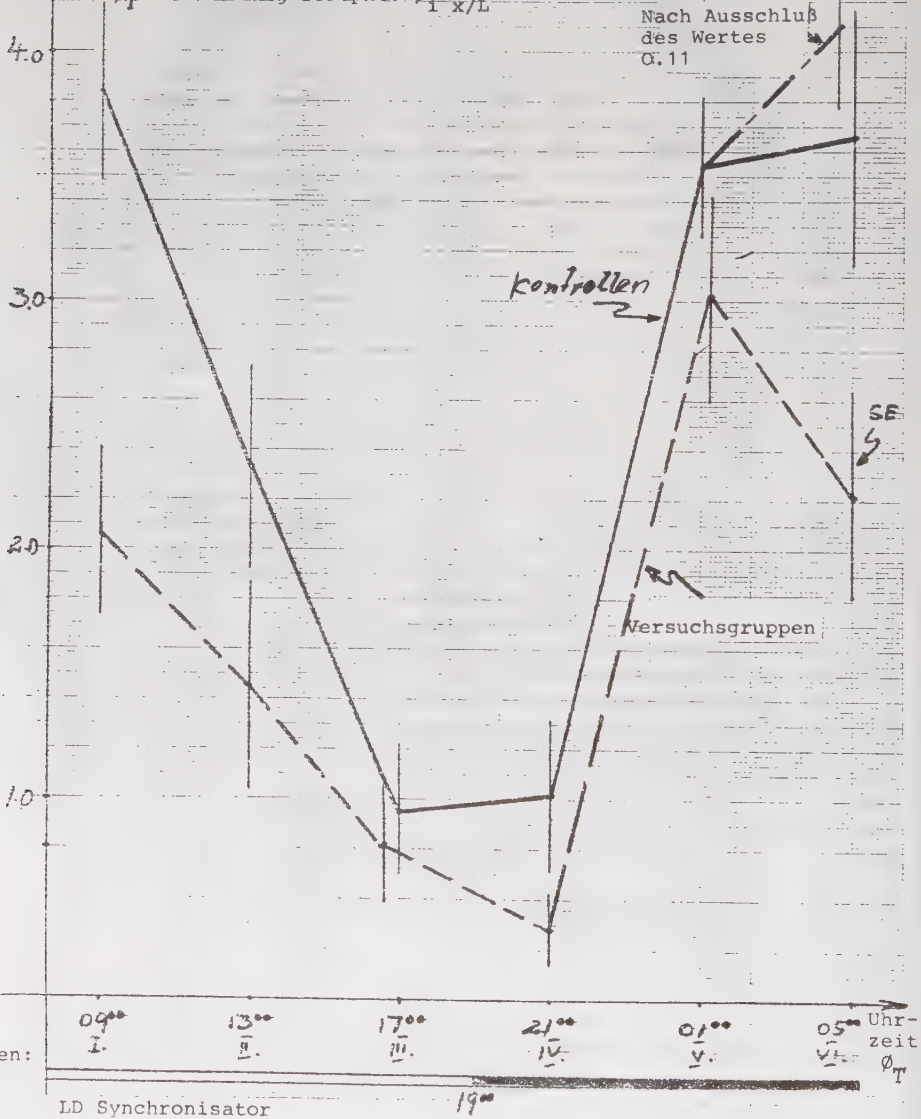
Solu-Medrol-Empfindlichkeits-Studie
Leberglycogen

Unterschiedliche Leberglycogen (mg%) Konzentration zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol (ϕ_{iR})- oder Lösungsmittelapplikation (ϕ_{iL}). Geringster Wirkungsunterschied der Cortisonbehandlung bei 17 Uhr und 01 Uhr.

ϕ_{iR} = Phasen der i.p.-Inj. von 1mg Solu Medrol (Methylprednisolon)

ϕ_{iL} = Phasen der i.p.-Inj. von 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide)

ϕ_T = Tötung z.Ztpkt. ϕ_{iR}/L



Die nach der Methode der Anpassung kleinster Quadrate analysierten Daten der Cortison-behandelten Versuchsgruppen (Tab. 14) ergaben mit großer statistischer Signifikanz $P = .001$ einen Circadian-Rhythmus. Dabei wird deutlich, daß durch Circadian-System-Phasen bezogene Methylprednisolon-Applikation keine Desynchronisation des Leberglycogen-Rhythmus entstand. Die Acrophase des Leberglycogen-Gehaltes der Versuchsgruppen mit Vertrauensbogen zwischen -37° und -106° eilt der Acrophase des Leberglycogen-Gehaltes bei Kontrollgruppen wenig voraus.

Drückt man die absolute Differenz zwischen dem Leberglycogen-Gehalt der Kontroll- und Versuchsgruppen in Prozent aus, so findet man zum Zeitpunkt des höchsten Serumcorticosteron-Gehaltes (17.⁰⁰) eine geringste und in der Zeit zwischen 01.⁰⁰ und 09.⁰⁰ die größte Differenz (Abb.30).

Berechnet man ferner nach der Formel $(1 - \frac{E}{C}) \cdot 100$ die Unterschiede der beiden Gruppen-Mittelwerte durch den prozentualen Abfall zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen, so sieht man (Abb. 31) den geringsten prozentualen Abfall um 17.⁰⁰ und 01.⁰⁰.

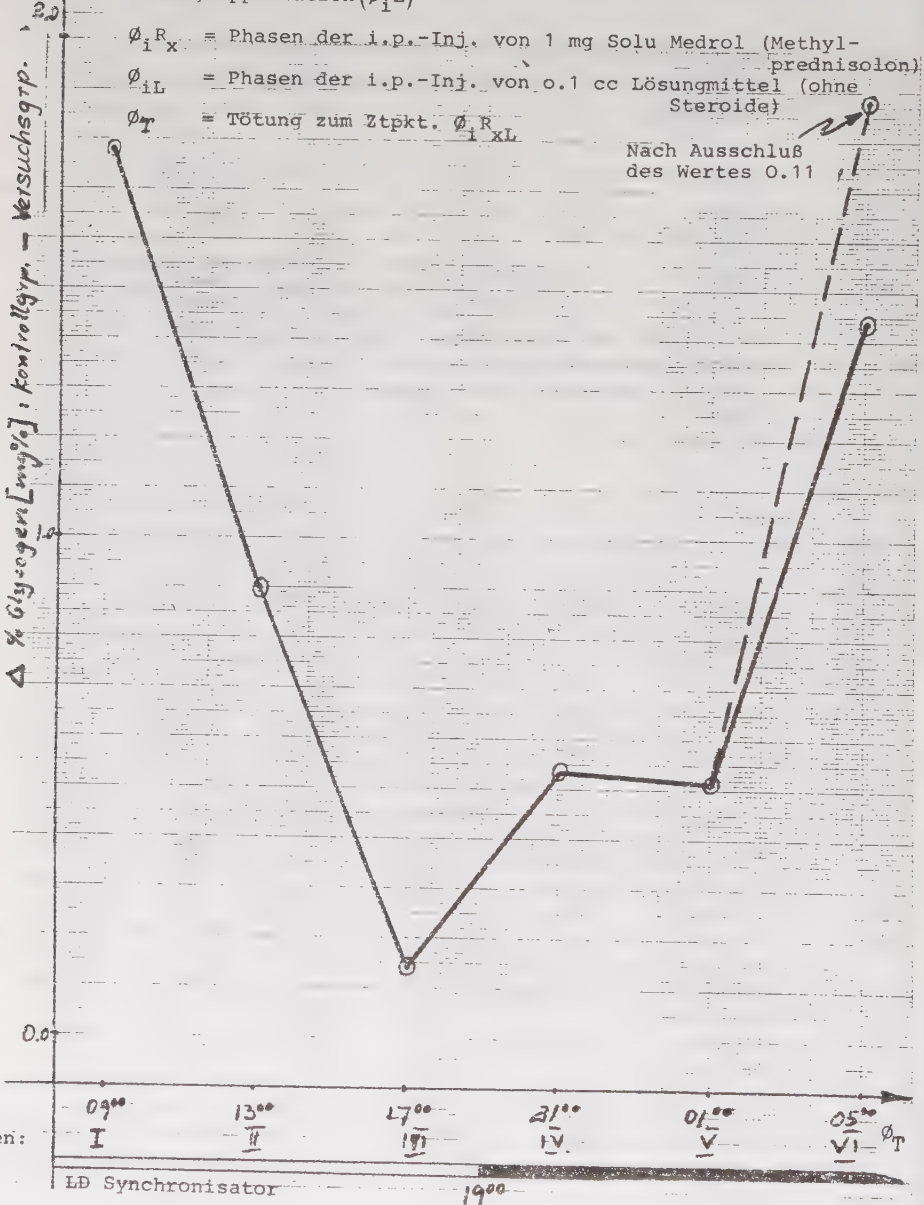
Solu-Medrol-Empfindlichkeitsstudie

Leberglycogen

Prozentualer Unterschied der Leberglycogenkonzentration zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol (ϕ_{iR}) oder Lösungsapplikation (ϕ_{iL})

ϕ_{iR} = Phasen der i.p.-Inj. von 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon)
 ϕ_{iL} = Phasen der i.p.-Inj. von 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide)
 ϕ_T = Tötung zum Ztpkt. ϕ_{iR}

Nach Ausschluß des Wertes 0.11



Gruppen:

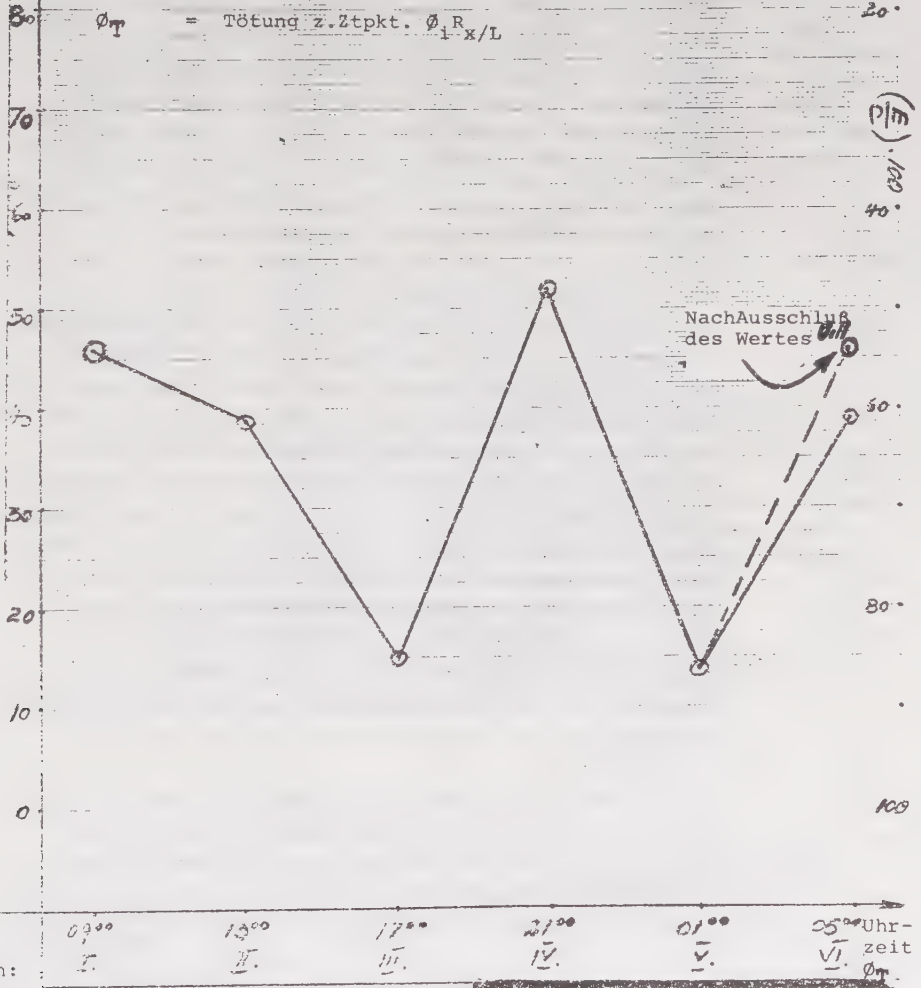
Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie

Leberglycogen

Prozentualer Abfall der Leberglycogenkonzentration zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen nach 8-tägiger Circadian-System-Phasen bezogener Solu Medrol (ϕ_{iR}) oder Lösungsmittelapplikation (ϕ_{iL})

% Abfall der Leberglycogen-Konzentration
(Versuchsgruppen/Kontrollen)

- ϕ_{iR} = Phasen der i.p.-Injektion von 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon)
 ϕ_{iL} = Phasen der i.p.-Injektion von 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide)
 ϕ_T = Tötung z.Ztpkt. ϕ_{iR}/L



LD: Synchronisator

19:00

Serum- und Nebennieren-Corticosteron

Die Suppression der Nebenniere wurde in dieser Studie einmal durch den Vergleich der Nebennieren- und zum anderen der Serumcorticosteron-Konzentrationen zwischen Solu Medrol-injizierten Versuchstieren E und Kontrolltieren C dargestellt. Die nach der Methode von Mattingly (1962) bestimmten Serumcorticosteronwerte sind in $\mu\text{g\%}$ für die einzelnen Gruppen in Abb. 32 aufgetragen.

In allen Fällen war der Serumcorticosteronspiegel bei den Versuchsgruppen geringer als bei den Kontrollgruppen. In Anbetracht der Tatsache, daß die Versuchsgruppen über 8 Tage -zuletzt 24 h vor Dekapitation- mit Steroiden behandelt wurden, kann die Verringerung des Serumcorticosteron-Gehalts in diesem Zusammenhang gesehen werden. Das gleiche Phänomen zeigt sich in etwa im Corticosteron-Gehalt der Nebennieren.

Wie im Kapitel "biochemische Methoden" beschrieben ist, wurden die Nebennieren der einzelnen Tiere gruppenweise homogenisiert und der Corticosteron-Gehalt bestimmt. Die in Abb. 33 aufgetragenen Kurven geben einen etwa sinusförmigen Verlauf wieder. Dabei wird deutlich, daß der Nebennieren-Hormongehalt der Cortison-behandelten Versuchsgruppen gegenüber den Kontrollgruppen im Durchschnitt niedriger war. Zum Zeitpunkt des bei der Maus physiologisch höchsten Corticosteron-Gehaltes der Nebenniere konnte keine Verminderung gesehen werden. Errechnet man zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen die absoluten Differenzen des Corticosteronspiegels im Serum (Abb. 34) und desgleichen in der Nebenniere (Abb. 35), so zeigt sich in beiden Kurven ein geringster Unterschied zum Zeitpunkt der Solu Medrol-Applikation um 17.00.

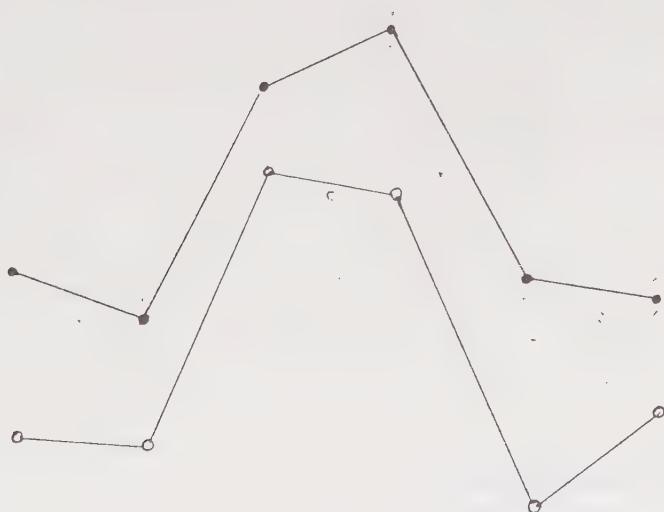
Eine Reduktion des Nebennieren- (Abb. 36) wie auch Serum- (Abb. 37) Hormongehaltes, berechnet nach der Formel $(1 - \frac{E}{C}) \cdot 100$, war am größten bei den Tieren der Gruppe, die um 01.00 injiziert und getötet wurden.

Abb. 32

Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie
Serum-Corticosteron-Konzentration

Bei allen Gruppen der Versuchstiere, die über 8 Tage zu unterschiedlichen Circadian-System-Phasen bezogenen Zeiten (zuletzt 24 h vor Dekapitation) Solu Medrol (ϕ_{iR_x}) injiziert bekamen, ist im Vergleich zu den Kontrolltieren (ϕ_{iL}) ein deutlich verminderter Serum-Corticosteron-Spiegel festzustellen.

- — ● Kontrollgruppen
○ — ○ Versuchsgruppen



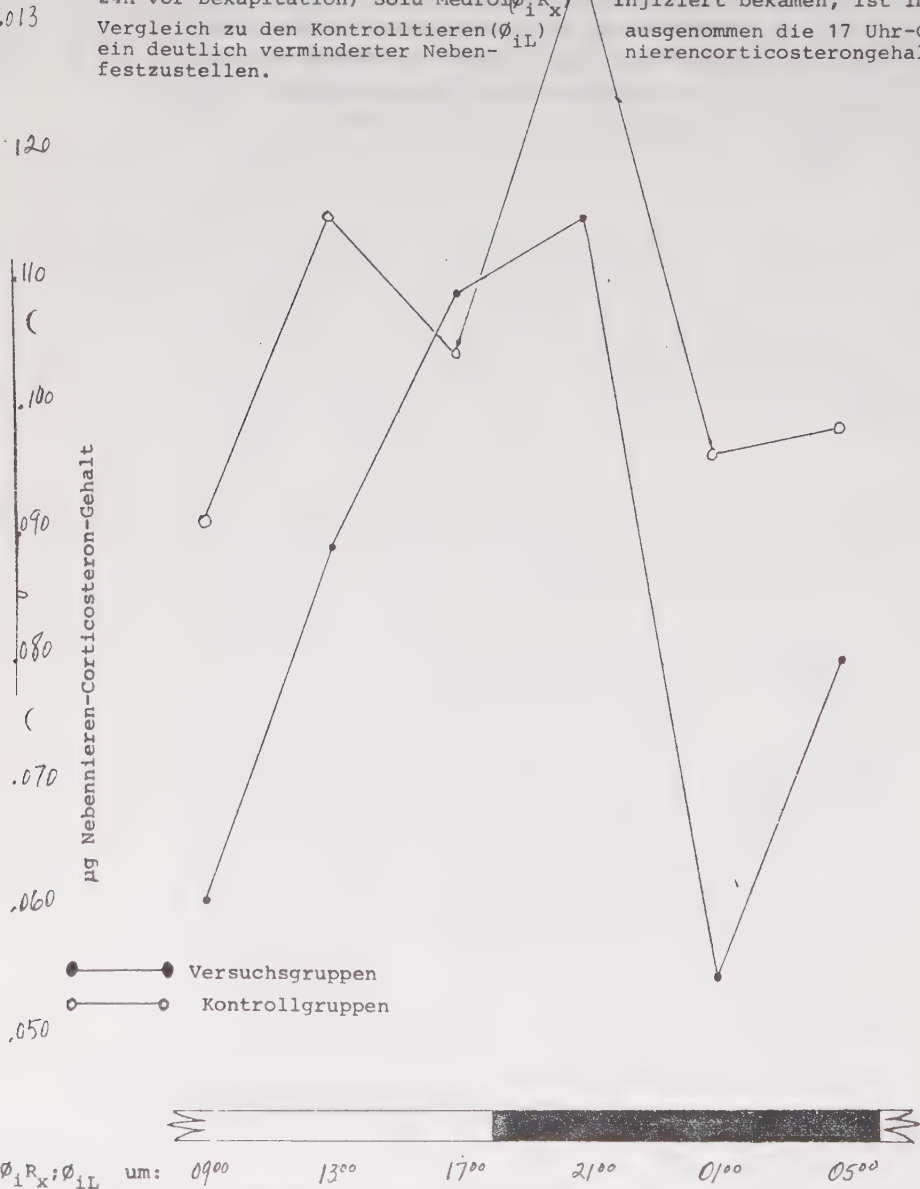
ϕ_{iR_x} ; ϕ_{iL} um 0900

ϕ_{iR_x} = Phasen der i.p.-Inj. von 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon)
 ϕ_{iL} = Phasen der i.p.-Inj. von 0.1 cc Lösungsmittel

Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie
Nebennieren-Corticosteron-Gehalt

Bei allen Gruppen von Versuchstieren, unterschiedlichen Circadian-System-Phasen 24h vor Dekapitation) Solu Medrol (ϕ_{iR}) Vergleich zu den Kontrolltieren (ϕ_{iL}) ein deutlich verminderter Nebennieren-Corticosteron-Gehalt festzustellen.

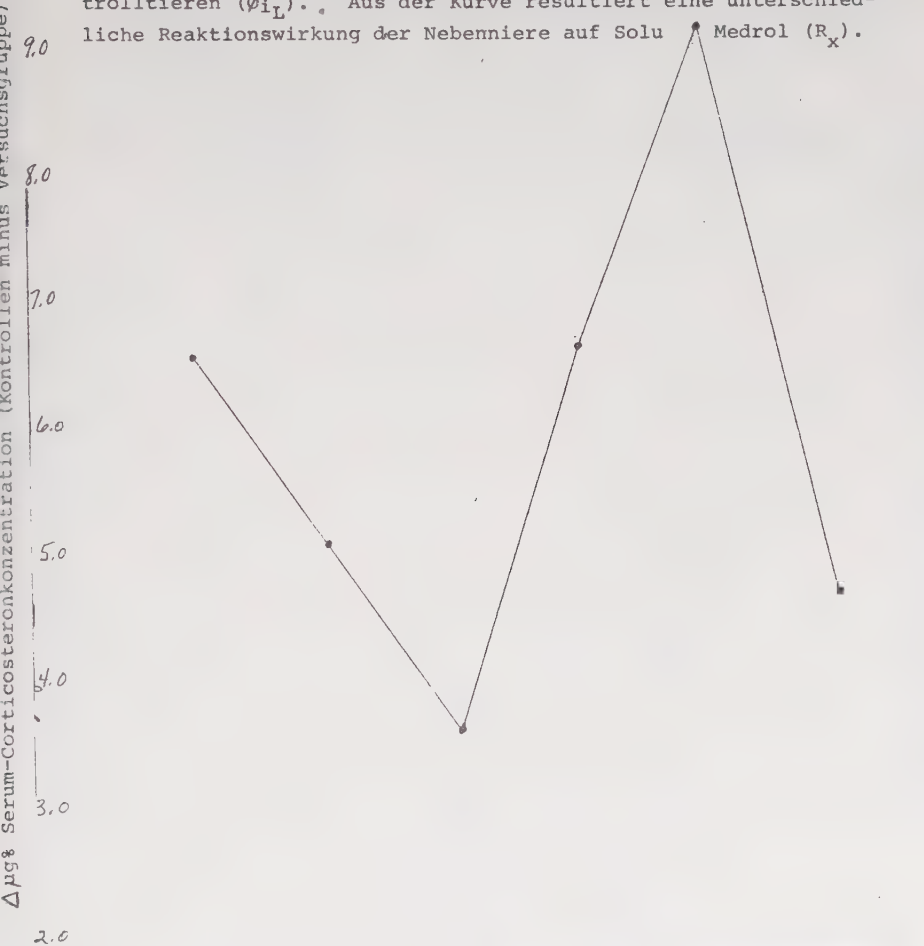
die über 8 Tage zu unterschiedlichen Zeiten (zuletzt injiziert bekamen, ist im Ausgenommen die 17 Uhr-Gruppe



ϕ_{iR} ; ϕ_{iL} um: 0900 1300 1700 2100 0100 0500
 ϕ_{iR} = Phasen der i.p.-Inj. von 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon)
 ϕ_{iL} = Phasen der i.p.-Inj. von 0.1cc Lösungsmittel

Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie
Serum-Corticosteron-Konzentration

Absolute Differenz zwischen Serum Corticosterongehalt von Circadian-System-Phasen behandelten Versuchs- (ϕ_{iR_x}) und Kontrolltieren (ϕ_{iL}). Aus der Kurve resultiert eine unterschiedliche Reaktionswirkung der Nebenniere auf Solu Medrol (R_x).



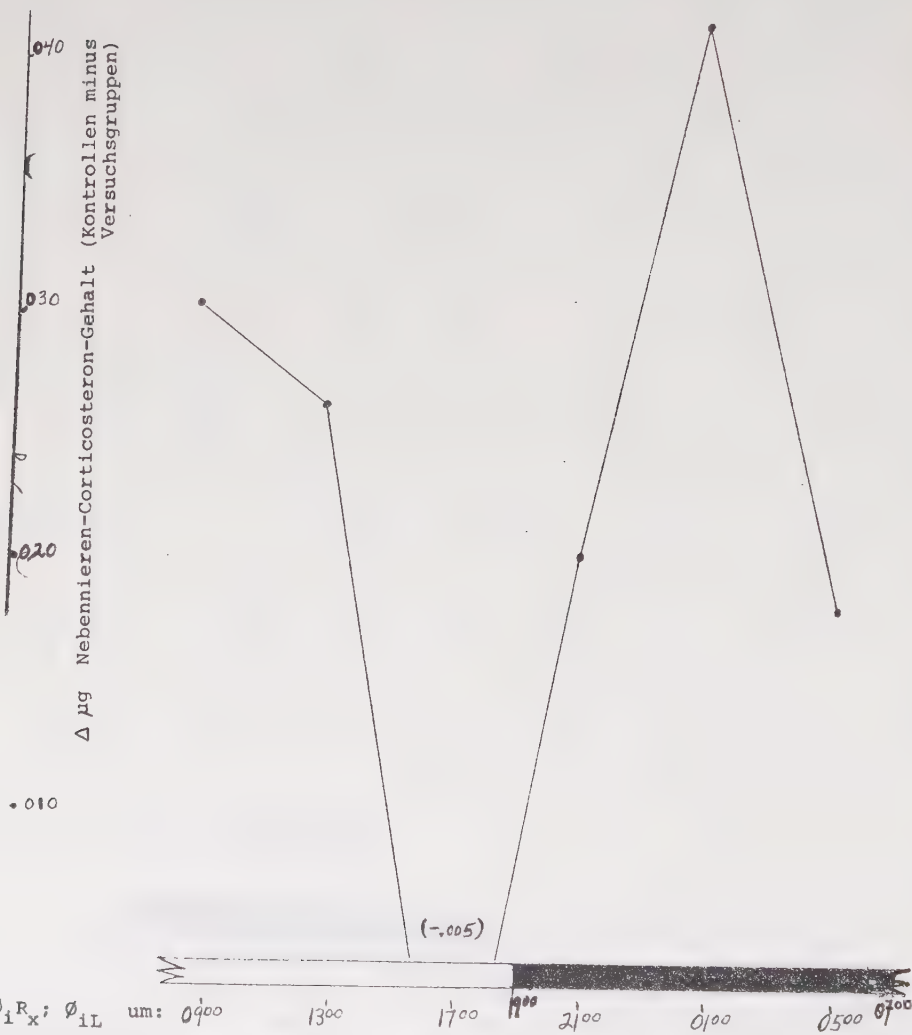
$R_x; \phi_{iL}$ um: 0900 1300 1700 2100 0100 0500

ϕ_{iR_x} = Phase der i.p.-Injektion von 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon)

ϕ_{iL} = Phase der i.p.-Injektion von 0.1 cc Lösungsmittel

Solu Medrol-Empfindlichkeitsstudie
Nebennieren-Corticosteron-Gehalt

Absolute Differenz zwischen Serum-Corticosterongehalt von Circadian-System-Phasen behandelten Versuchs- (ϕ_{iR_x}) und Kontrolltieren (ϕ_{iL}). Aus der Kurve resultiert eine unterschiedliche Reaktionswirkung der Nebenniere auf Solu-Medrol (R_x).



ϕ_{iR_x} = Phase der i.p.-Injektion von 1 mg SoluMedrol (Methylprednisolon)

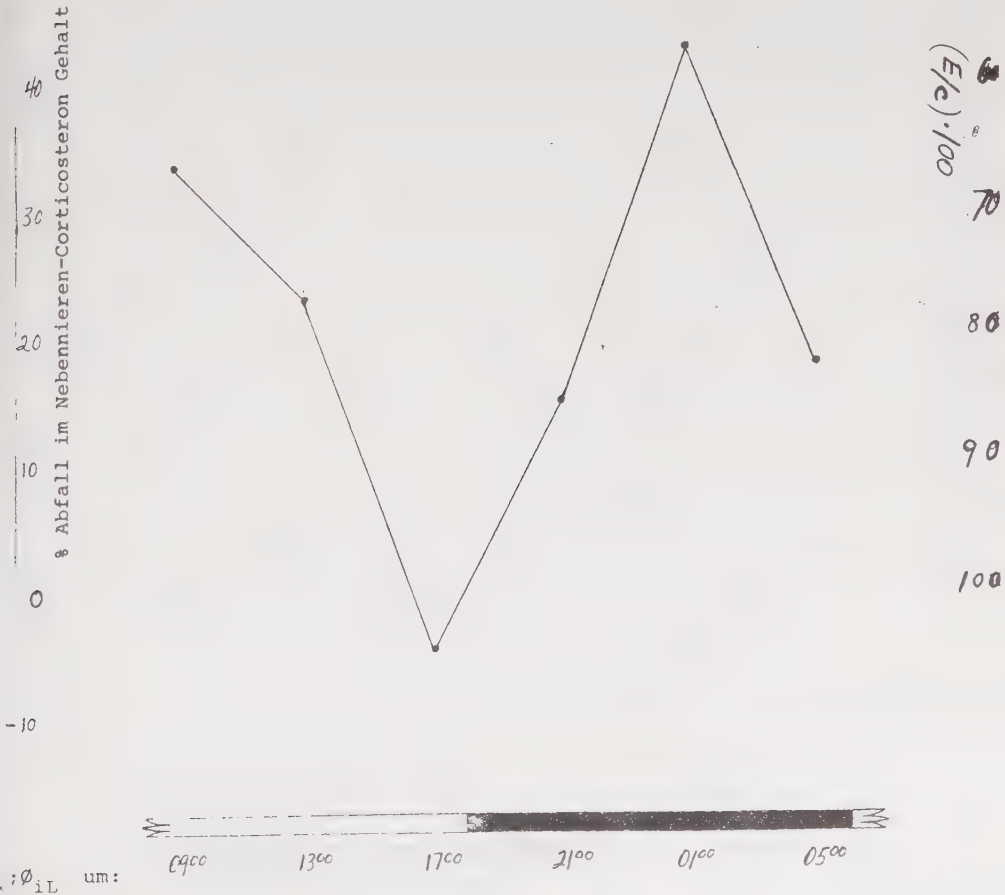
ϕ_{iL} = Phase der i.p.-Injektion von 0.1^{CC} Lösungsmittel.

Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie
Nebennieren-Corticosteron-Gehalt

Prozentualer Abfall der Nebennieren Corticosteronkonzentration bei Versuchsgruppen gegenüber Kontrollgruppen als Ergebnis unterschiedlicher Reaktionswirkung der Nebenniere auf Circadian-System-Phasen bezogen appliziertes Cortison (ϕ_{iR_x}) im Vergleich zu Lösungsmittel (ϕ_{iL})

ϕ_{iR_x} = Phasen der i.p.-Injektion von 1 mg Solu Medrol (Methylprednisolon)

ϕ_{iL} = Phasen der i.p.-Injektion von 0.1 cc Lösungsmittel (ohne Steroide)

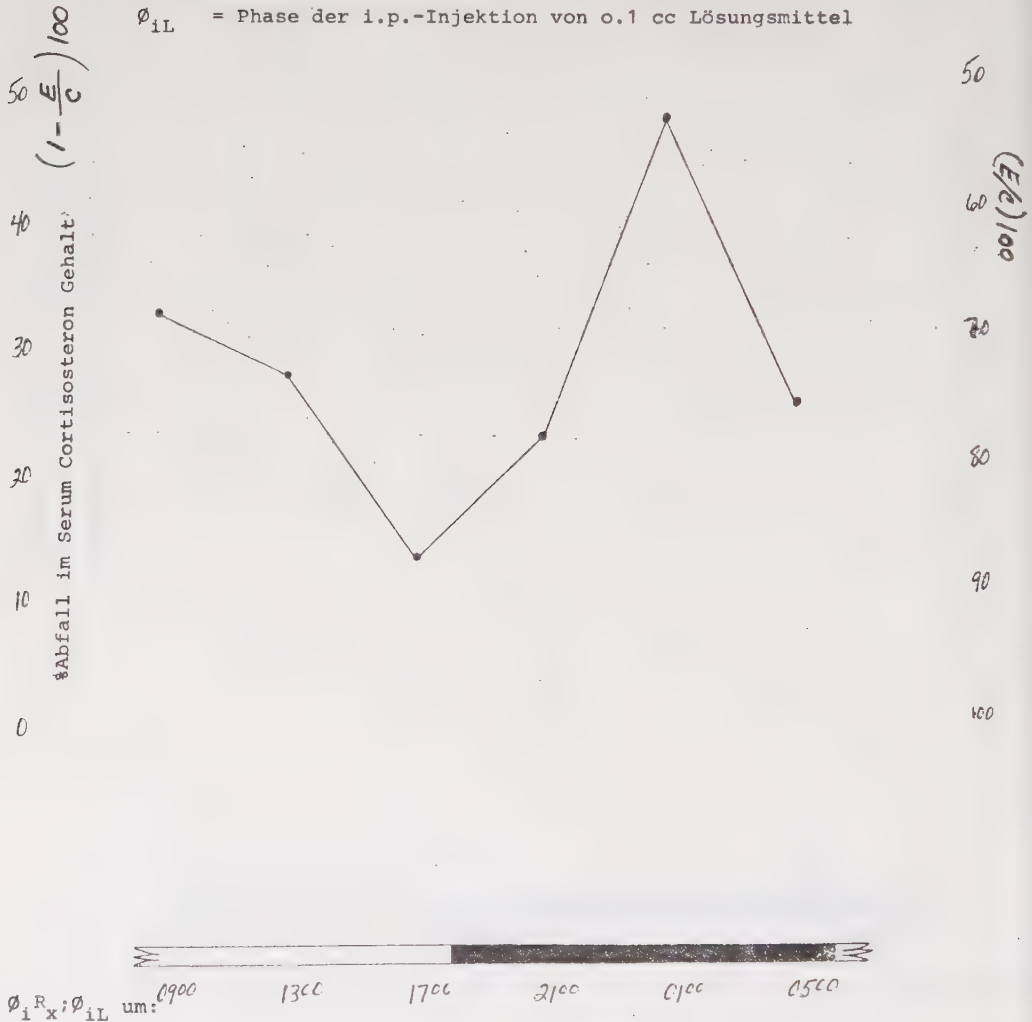


Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie
Serum-Corticosteron-Konzentration

Prozentualer Abfall der Serum Corticosteron Konzentration
bei Versuchsgruppen gegenüber Kontrollgruppen als Ergebnis
unterschiedlicher Reaktionswirkung der Nebenniere auf
Circadian-System-Phasen bezogen appliziertes Cortison (ϕ_{iR_x})
im Vergleich zu Lösungsmittel (ϕ_{iL})

ϕ_{iR_x} = Phase der i.p.-Injektion von 1 mg Solu Medrol
(Methylprednisolon)

ϕ_{iL} = Phase der i.p.-Injektion von 0.1 cc Lösungsmittel



Nahezu keine Hemmwirkung auf die Nebenniere war bei den Tieren zu verzeichnen, die bei einer Licht-Dunkel-Synchronisation L: 07.00 - 19.00 Solu Medrol nahe der erwarteten Circadian-Acrophase für Nebennieren Corticosteron erhielten.

Ähnlich war das Ausmaß der Corticosteroid-induzierten Nebennierenatrophie statistisch signifikant größer bei den Mäusen, die während der Phase erwartet geringster Nebennierenrindensekretion behandelt wurden.

Ergebnisse der klinischen Studie

Die Untersuchungen von Ausatemstoß, Rektal-Temperatur, Radialis-Puls, Blutdruck (systolisch und diastolisch), Urinvolumen bei asthmatischen Kindern verschiedenen Schweregrades (Gruppe 1: abgeklungenes Asthma; Gruppe 2: leichtes Asthma; Gruppe 3: schweres Asthma) sind nach der Cosinor-Auswertung in der Tab. 21 zusammengefaßt. Nur für den Atemstoß-Wert und die Rektal-Temperatur konnte mit Ausnahme der 3. Gruppe für Radialis-Puls ein Rhythmus mit statistischer Signifikanz nachgewiesen werden. *)

Bei den übrigen Parametern überlappt im Chronogramm die Fehlerellipse den Ursprung der Zeigerdarstellung. Die Acrophasen mit ihren 95%igen Vertrauensbereichen sind, bezogen auf die Ortszeit 0.00, in der letzten Spalte angegeben.

Circadiane Periodizität von Rektal-Temperatur und Ausatemstoß (PEFR)

In der Tab. 22 werden die Ergebnisse für Rektal-Temperatur und Atemstoß-Wert (PEFR) der 3 untersuchten Gruppen mit den circadianen Acrophasen und 95%igen Vertrauensbögen in Bezug auf die lokale Uhrzeit 0.00 und, bezogen auf die Mitte der Dunkelperiode, eines durch den Synchronisator gegebenen Licht-Dunkel-Wechsels (L: 07.00 - 21.00; D: 21.00 - 07.00) einander gegenübergestellt.

Beim Ausatemstoß-Wert wurde außerdem als Phasenreferenz die Acrophase der Temperatur gewählt. Ein Phasen-Diagramm (Abb. 38) veranschaulicht diese Ergebnisse in graphischer Darstellung. Man kann erkennen, daß für alle 3 Gruppen sowohl bei der Rektal-Temperatur als auch bei dem Ausatemstoß-Wert keine Phasenverschiebungen

Gruppe 1 abgeklingenes Asthma (ohne Steroidbehandlung)
 Gruppe 2 leichtes Asthma (ohne Steroidbehandlung)
 Gruppe 3 schweres Asthma (mit Steroidbehandlung)

Gruppen	Funktionen	n	Fehlerellipse, Vertrauens- koeffizient	Amplitude	+ Sigma	Phase in Grad bezogen auf Orts- zeit 000
1 2 3	Atemstoß	11 14 14	- - -	44,73 42,24 32,80	1 5,32 15,16 11,00	208,1 (191,4 - 227,9) 195,3 (172,8 - 216,9) 225,9 (210,0 - 241,4)
1 2 3	Temperatur	11 14 14	- - -	1,10 1,15 ,85	,29 ,38 ,34	234,1 (217,5 - 252,0) 226,7 (207,5 - 242,7) 219,0 (195,3 - 245,1)
1 2 3	puls	11 15 14	,950 ,975 -	3,64 9,76 6,57	3,58 8,32 3,67	245,5 (329,4 - 176,1) 237,6 (337,9 - 216,7) 211,9 (239,8 - 181,4)
1 2 3	RR syst.	11 15 14	,800 ,700 ,700	2,86 1,39 1,26	2,52 3,12 2,18	185,7 (239,8 - 114,8) 51,4 212,0
1 2 3	RR diastol.	11 15 14	,700 ,900 ,800	1,66 8,37 2,61	2,40 8,31 2,24	41,9 43,2 (71,5 - 280,0) 42,9 (108,8 - 358,6)
1 2 3	Urinvolumen	11 15 14	,700 ,700 ,950	11,64 14,70 37,00	18,05 30,15 33,17	300,2 291,6 234,7 (285,0 - 190,4)

Tab. 22

COSINOR-ERGEBNISSE EXTERNER UND INTERNER CIRCADIAN-
ACROPHASEN DER RECTAL-TEMPERATUR UND DES AUSATEM-
STOSSES (PEFR) BEI GRUPPEN VON:

- 1) 11 Kindern mit Asthma in Remission
- 2) 15 Kindern mit mäßigem Asthma ohne Steroidbehandlung
- 3) 14 Kindern mit schwerem, steroidabhängigem Asthma

Circadian Acrophase (95 % Vertrauensbogen)

Gruppen	Ø in Stunden Ref.: Ortszeit 00 ⁰⁰	Ref.: Mitte der Dunkelperiode Ø in Graden	Ref. Temperatur
---------	---	---	-----------------

Rectaltemperatur

1	15 ⁰⁴ (14 ⁰⁰ bis 16 ¹⁶)	-196° (-180 bis -214)
2	14 ³⁶ (13 ²⁰ bis 15 ⁴⁰)	-189° (-170 bis -205)
3	14 ⁰⁴ (12 ²⁸ bis 15 ⁴⁸)	-181° (-157 bis -207)

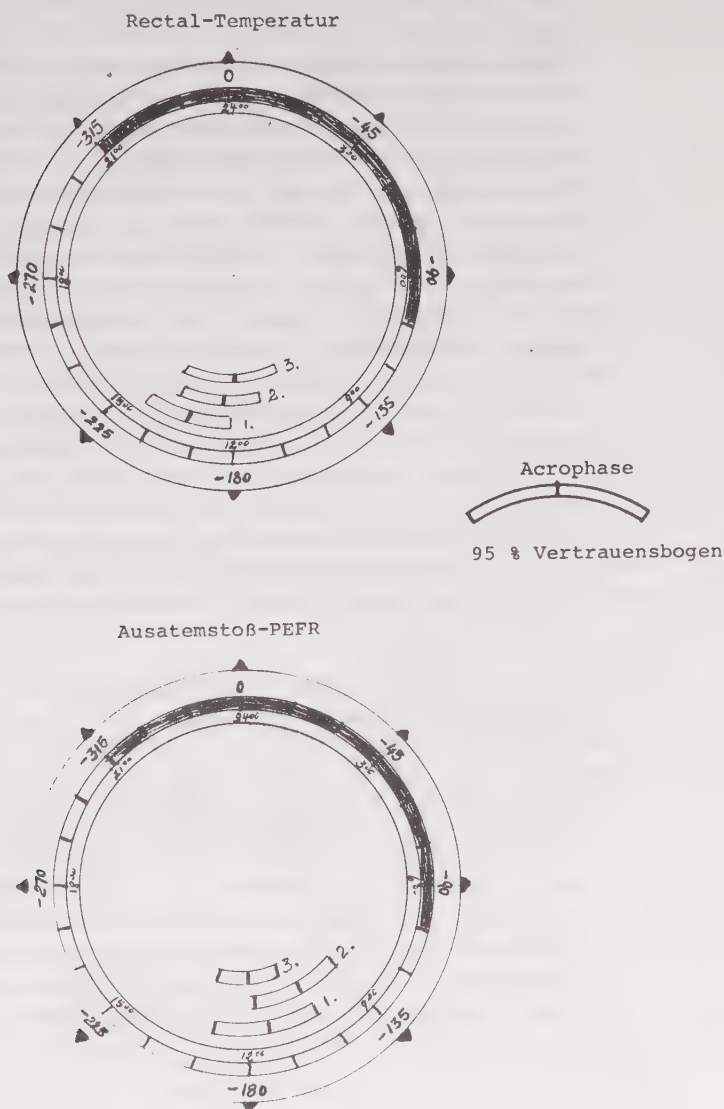
Ausatemstoß PEFR

1	13 ⁵² (12 ¹² bis 14 ⁴⁰)	-178° (-153 bis -190)	+18 (+6 bis + 43)
2	12 ²⁸ (11 ⁰⁰ bis 13 ⁵⁶)	-157° (-135 bis -179)	+32 (+10 bis +54)
3	14 ³² (13 ²⁸ bis 15 ³²)	-188° (-172 bis -203)	- 7 (-9 bis +22)

$\tau = 360^\circ = 24 \text{ hrs}$; $15^\circ = 1 \text{ hr}$. Synchronisator: L07⁰⁰ - 21⁰⁰; D21⁰⁰ - 07⁰⁰.

CIRCADIANE ACROPHASEN ASTHMATISCHER KINDER *

Polar-Phasen-Diagramme



- * Gruppen:
1. 11 Kinder mit Asthma in Remission
 2. 15 Kinder mit mäßigem Asthma ohne Steroidbehandlung
 3. 14 Kinder mit schwerem, steroidabhängigem Asthma

zwischen den einzelnen Gruppen bestehen. Die Vertrauensbögen der Acrophasen beider Funktionen überlappen sich bei allen 3 Gruppen.

Eine longitudinale Kleinst-Quadrat-Spektren-Analyse einzelner PEFR-Zeitreihen der Kinder aus der Hauptstudie ergaben zum größten Teil Perioden in der unmittelbaren Nähe des 24-h-Rhythmus. Die mittlere Gruppenperiode τ konnte von 24 h nicht unterschieden werden; für die Gruppe als Ganzes scheint somit die Annahme eines 24-h-synchronisierten PEFR-Rhythmus gerechtfertigt. Im Hinblick auf dieses Ergebnis werden die Uhrzeiten der Medikamentenapplikation in Verbindung mit dem korrespondierenden Synchronisator, dem Licht-Dunkel-Wechsel von 07.00 bis 21.00, betrachtet als Indizes verschiedener Phasen des 24-h-synchronisierten respiratorischen Subsystems. Es wird nun die Frage gestellt, ob in dieser Studie die Uhrzeiten so, wie sie eben als Phasenpunkte eines Rhythmus qualifiziert wurden, bestimmend waren für die Wirkung der gegebenen Medikation auf eine Gruppe von Versuchspersonen.

Circadian-System-Phasen abhängige Wirkung von Solu Medrol auf den PEFR-Rhythmus

Größtes Interesse gilt aber zunächst der Frage, ob im Gesamtniveau des Ausatemstoßes (PEFR) Gruppenunterschiede auftraten. Wurden die unkorrigierten PEFR-Werte ausgewertet als Funktion der Zeit, die für die verlängerte Prednison-Therapie von Asthmakranken gewählt wurde, so bestanden zwischen den Gruppen, die jeweils das Medikament zu verschiedenen circadianen Phasen erhalten hatten, relativ geringe Unterschiede.

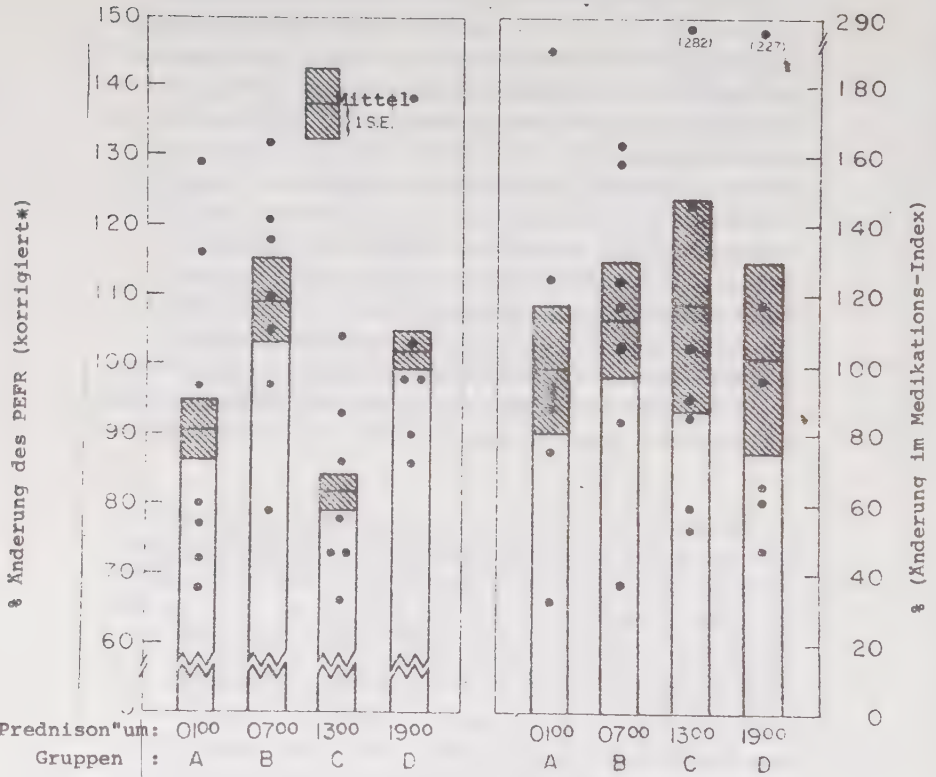
Für Gruppe B, in der während der Zeit nach dem 3. Juni das Steroid-Präparat täglich um 07.⁰⁰ eingenommen wurde, waren PEFR-Durchschnittswerte, ausgedrückt als Prozentsatz der Ausatemstoß-Werte derselben Versuchspersonen vor dem 3. Juni, im Durchschnitt 4% höher. Man muß bedenken, daß die Kinder der Gruppe B die Medikation vor dem 3. Juni um 08.⁰⁰ (± 10 Min.) und danach um 07.⁰⁰ (± 10 Min.) erhalten hatten. Die Medikationsapplikationszeit war für die Gruppe B am geringsten, nämlich nur um 1h, modifiziert worden. Diese geringe Änderung soll als Bezugsstandard für jegliche Medikationswirkungen in den anderen Gruppen gelten. Änderungen der aufgezeichneten, nicht korrigierten PEFR-Werte vor und nach dem 3. Juni, wie sie von Daten der Patienten, die Prednison zu anderen Zeiten als 07.⁰⁰ (Gruppe B) erhalten hatten, aus den Gruppen A, C und D berechnet wurden, zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede am 5%-Niveau. Nur dann, wenn korrigierte PEFR-Werte, wie sie in Abb. 39 graphisch dargestellt sind, einer Varianz-Analyse unterworfen wurden, konnte nahe am 5%-Niveau (Tab. 23) eine statistisch signifikante Zwischengruppendifferenz der prozentualen Änderung demonstriert werden.

Weiter erkennt man in Abb. 39, daß mit dem Anstieg der PEFR-Werte für Gruppe B (eine Verringerung der Luftwegverengung) ein Anstieg im Medikationsindex verbunden war, ein Umstand also, der den Vorteil für die Gruppe B, wie er ihr im Vergleich zu den anderen durch die täglich um 07.⁰⁰ erfolgte Zeit-Therapie zukam, verringert.

Die Abb. 40 zeigt die Acrophasen des PEFR-Rhythmus bei verschiedenen Gruppen von Kindern, die die tägliche Corticosteroid-Therapie zu verschiedenen Phasen ihres circadianen, respiratorischen Untersystems erhalten hatten. Auf der Abszisse dieser Abbildung wird für die

Abb. 39

BEHANDLUNGS-EFFEKT BEZOGEN AUF DIE CIRCADIAN-
SYSTEM-PHASE BEI STERIODABHÄNGIGEN, SCHWER
ASTHMATISCHEN KINDERN



BEHANDLUNGS-ZEIT-SCHEMA
für (synthetisches) Corticosteroid R_x

- * Zur Ermittlung der Werte, wie sie als Punkt angegeben sind, werden Mittelwerte der Aufzeichnungen nach Beginn der Zeitbehandlung R_x als % der Mittelwerte des gleichen Parameters vor der Zeitbehandlung R_x ausgedrückt.

Tab. Nr. 23

Circadian-System-Phasen abhängige Wirkung von Prednison auf den Ausatemstoß (PEFR), ein Maß für Luftwegsverengung bei steroidabhängigen, schwer asthmatischen Kindern. *

	Prednison tgl. 07 ⁰⁰	Prednison tgl. 01 ⁰⁰ oder 13 ⁰⁰ oder 19 ⁰⁰	
gebessert **	a = 5	b = 5	a + b = 10
nicht gebessert	c = 2	d = 15	c + d = 17
gesamt	7	20	N = 27

Fisher Test: einseitig $P \approx .043$; doppelseitig $P \approx .086$

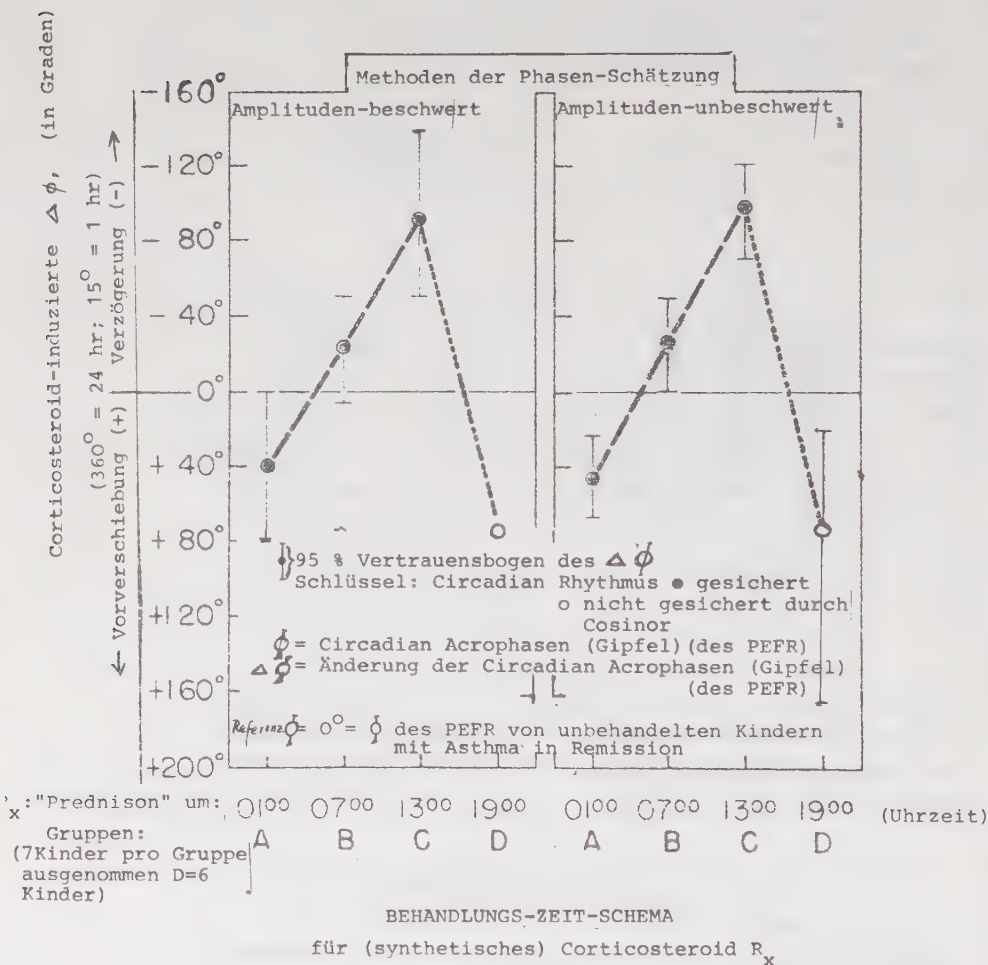
$$\chi^2 = 3.0 \quad (\chi^2_{.95} = 3.84; \chi^2_{.90} = 2.71)$$

* PEFR korrigiert im Bezug auf den Circadian Rhythmus und durch Ausschluß der PEFR-Werte, die im Wirkungsbereich zusätzlich zur Standardbehandlung notwendiger ad hoc Medikation ausgezeichnet wurden.

** Alle Kinder erhielten vor Beginn der Studie eine tägliche Corticosteroid-Behandlung. Eine Zustandsbesserung gibt hier keinen Vergleich der PEFR-Werte zwischen Corticosteroidbehandlung oder Nichtbehandlung an, sondern stellt vielmehr einen PEFR-Wert-Vergleich vor und nach Änderung der Medikationszeit dar.

Abb. 40

PHASENVERSCHIEBUNG ($\Delta \phi$) DES CIRCADIAN-AUSATEMSTOSS (PEFR)-
RHYTHMUS ALS FUNKTION EINER AUF UNTERSCHIEDLICHE BEHANDLUNGS-
ZEIT BEZOGENEN LANGZEIT-CORTICOSTEROID-THERAPIE (R_x)
SCHWER ASTHMATISCHER KINDER.



Gruppen A, B, C und D die jeweilige Medikationszeit 01.⁰⁰, 07.⁰⁰, 13.⁰⁰ und 19.⁰⁰ angegeben. Jedes Kind innerhalb einer gegebenen Gruppe erhielt das Steroid einmal am Tag und zwar täglich zur gleichen Uhrzeit, ± 10 Min.

Die graphisch dargestellten circadianen PEFR-Acrophasen wurden für jede Gruppe von Zeitreihen durch 2 verschiedene Methoden berechnet. In einem dieser Verfahren, der Cosinor-Methode, wurde eine amplitudenbeschwerte Acrophasenschätzung vorgenommen (siehe Erläuterung dieser Methode im Kapitel "statistische Verfahren").

Die andere Methode ergab ein unbeschwertes ϕ . Welche Methode auch immer für die Berechnung des ϕ gewählt wurde, die erhaltenen Werte wurden so angepaßt, daß die Mitte der täglichen Schlafspanne, und nicht die Mitternacht der Ortszeit, Bezugspunkt der Phase war. Die in dieser Studie für jede Gruppe Prednison-behandelter Kinder erhaltene interne Acrophase ϕ wurde von der korrespondierenden internen PEFR-Acrophase (ebenfalls mit Bezug auf die Mitte der Schlafperiode berechnet) einer Gruppe unbehandelter Kinder mit Asthma in Remission abgezogen. Die Differenz zwischen dem ϕ einer bestimmten Prednison-behandelten Gruppe auf der einen und dem Referenz ϕ auf der anderen Seite, wurde als $\Delta\phi$ auf der Ordinate der Abb. 40 aufgetragen.

Die Angabe $\Delta\phi = 0^0$ in der Abb. 40 bedeutet keine Differenz zwischen dem ϕ der verglichenen Gruppen. Verzögerungen der Acrophase, wie sie durch Corticosteroid hervorgerufen wurden, sind durch negative Nummern, hingegen das Voreilen des ϕ durch positive $\Delta\phi$'s angegeben.

Der 95 %ige Vertrauensbogen der $\Delta\phi$ -Werte wird ebenfalls in Abb. 40 angegeben und muß bei der Auswertung der Kurve berücksichtigt werden. Wie ersichtlich ist, verändert die täglich um 0,7⁰⁰ durchgeführte Prednison-Therapie das ϕ des PEFR-Rhythmus unmerklich, da der Vertrauensbogen des $\Delta\phi$ für Gruppe B die Null-Grad-Ebene überlappt.

Diese Schlußfolgerung wird bestätigt durch die gute Übereinstimmung der Ergebnisse aus der Berechnung des amplitudenbeschwerten $\Delta\phi$ -Wertes für Gruppe B einerseits (linke Seite der Abbildung) und dem korrespondierenden, nicht durch die Amplitude beschwerten $\Delta\phi$ -Wertes (rechte Seite der Abbildung) andererseits. Dieselbe Übereinstimmung gilt auch für die $\Delta\phi$ -Werte der zu anderen Zeiten behandelten Gruppen A, C und D, wie sie durch die beiden Methoden berechnet sind.

In der Gruppe, die das Prednison täglich um 13⁰⁰ erhielt, kann eine Verzögerung von ungefähr 80⁰ gesehen werden. Noch bedeutender ist die Tatsache, daß die Vertrauensbögen für die PEFR-Acrophase der C-Gruppe und die der anderen Gruppen nicht überlappen. Die abnorm späte Acrophase der C-Gruppe kann bezeichnet werden als eine iatrogen-induzierte, circadiane PEFR-Bradyphasie.

Bei der Gruppe, die das Corticosteroid täglich um 19⁰⁰ erhielt, wurde durch die Cosinor-Methode in den Ausatemstoß-Werten (PEFR) kein circadianer Rhythmus entdeckt.

Daher sind auf der linken Seite der Abbildung (Abb. 40) keine Vertrauensgrenzen für das $\Delta\phi$ dieser Gruppe aufgezeichnet.

Wie auf der rechten Seite der Abbildung gezeigt wird, hat die Acrophasenschätzung, die nicht durch die Amplitude beschwert ist, einen Vertrauensbogen, der die Null-Grad-Grenze nicht überlappt.

Ferner stimmt dieses $\Delta-\emptyset$ gut mit dem der Cosinor-Auswertung überein. Beide weisen auf ein Vorseilen des $\emptyset$ in dieser Gruppe hin. Es läßt sich in etwa denken, daß die täglich um 19.⁰⁰ gegebene Medikation eine circadiane Tachyphasie im PEFR-Wert induziert. Bei den Medikamentenapplikationen um 01.⁰⁰ wie auch um 19.⁰⁰ eilen die amplituden-unbeschwerten Acrophasen voraus.

Der PEFR-Rhythmus für die Gruppe A erreicht seinen höchsten Wert früher als der PEFR-Rhythmus der Bezugsgruppe (Rapid-Remitters).

Diese abnorm frühe interne Acrophase des circadianen PEFR-Rhythmus kann als eine iatrogene circadiane Tachyphasie bezeichnet werden.

Insgesamt scheint aus diesen Analysen klar hervorzugehen, daß die Prednison-Therapie, wenn sie zu verschiedenen Phasen des circadianen Systems angewandt wurde, keine einheitliche Wirkung zeigte. Wenn Steroide täglich um 07.⁰⁰, d.h. zur Acrophase des endogenen Plasma 17-OHCS-Rhythmus oder nahe dieser Acrophase gegeben wurde, blieb die PEFR-Acrophase nahezu unverändert. Vergleichbare Dosen des gleichen Medikamentes verursachten bei Applikation des Präparates zu einer anderen Circadian-System-Phase eine statistisch signifikante Verschiebung der Acrophase des circadianen PEFR-Rhythmus. Dieser Effekt, vermutlich abhängig von der Phase des circadianen respiratorischen Untersystems zum Zeitpunkt der Medikamentenapplikation, war eine statistisch signifikante Verzögerung, wenn das Medikament täglich um 13.⁰⁰ gegeben wurde. Im Gegensatz dazu wurde eine Vorverschiebung von $\emptyset$ verzeichnet, wenn das Medikament täglich

um 0.1⁰⁰ und um 19.00 gegeben wurde.

Circadian-System-Phasen abhängige Wirkung von Solu Medrol auf den K- und Cl-Ausscheidungsrythmus im Urin.

Wie aus den Abbildungen (Abb. 41 - 42) ersichtlich ist, waren die Circadian-Rhythmen der Kalium- und Chlorid-ausscheidung im Urin ebenfalls einer Phasenverschiebung durch Prednison unterworfen.

Das Ausmaß und die Richtung einer medikationsinduzierten Phasenverschiebung wurde für diese beiden Elektrolyt Ausscheidungsrythmen im Urin auf die korrespondierende innere Acrophase der Kinder mit mäßigem, nicht steroidbehandeltem Asthma (die Elektrolytwerte dieser Gruppe wurden aus der Vorstudie gewonnen) bezogen. Die Abbildungen (Abb. 43 und 44) zeigen eine Übereinstimmung der Ergebnisse der amplitudenbeschwerten und -unbeschwerten Phasenschätzung, wie sie bei der Analyse der PEF-Rhythmen in Abb. 39 gezeigt ist.

Auch für die Rhythmen der Kalium- und Chloridausscheidung im Urin war der Medikationseffekt auf die Acrophase eine Funktion der Circadian-System-Phase zum Zeitpunkt der Prednison-Applikation; (diese Phase wurde bei den Versuchspersonen, die einen 24-h-synchronisierten Circadian-Rhythmus zeigten, durch die Uhrzeit der Medikationsverabreichung annähernd dargestellt).

Zur Auswertung der Cortison-Zeit-Wirkung auf den PEF-Rhythmus wurde als Phasenbezugswert die interne Zeitgebung des PEF-Rhythmus bei Kindern mit Asthma in Remission, der Zeitgebung des PEF-Rhythmus bei Kindern mit mäßigem Asthma, bei denen eine geringe Therapie

Abb. 41

PHASENVERSCHIEBUNG ($\Delta\phi$) DES CIRCADIAN-K-AUSSCHIEDUNGS-RHYTHMUS IM URIN ALS FUNKTION EINER, AUF UNTERSCHIEDLICHE BEHANDLUNGSZEIT BEZOGENE LANGZEIT-CORTICOSTEROID-THERAPIE (R_x) SCHWER ASTHMATISCHER KINDER.

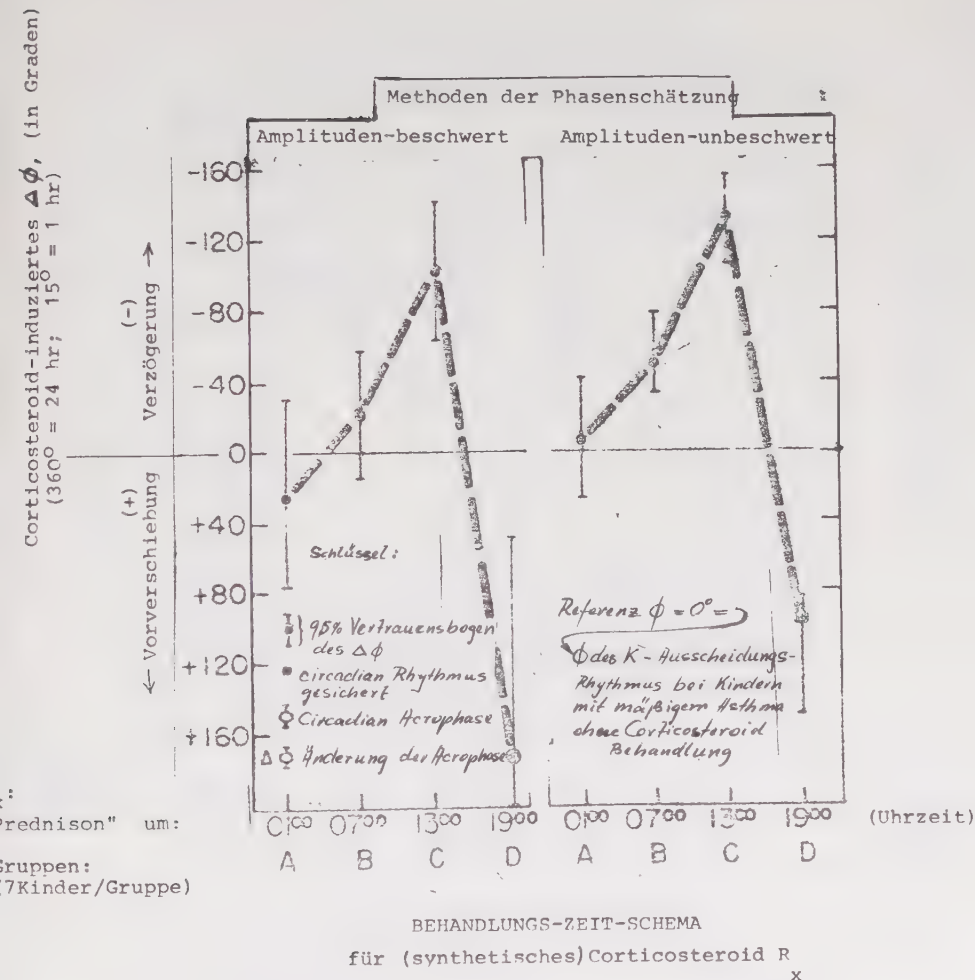


Abb. 42

PHASENVERSCHIEBUNG ($\Delta \phi$) DES CIRCADIAN-CL-AUSSCHIEDUNGS-RHYTHMUS IM URIN ALS FUNKTION EINER, AUF UNTERSCHIEDLICHE BEHANDLUNGSZEIT BEZOGENEN LANGZEIT-CORTICOSTEROID-THERAPIE (Rx) SCHWER ASTHMATISCHER KINDER.

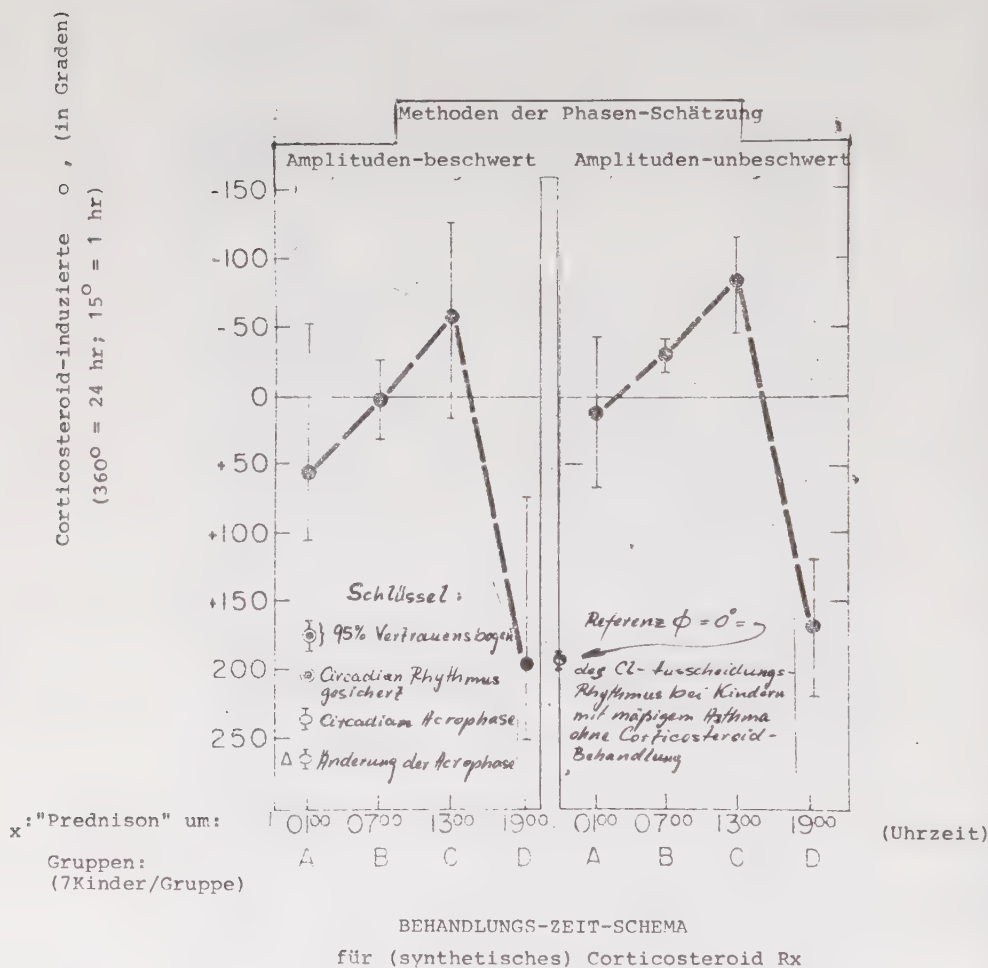
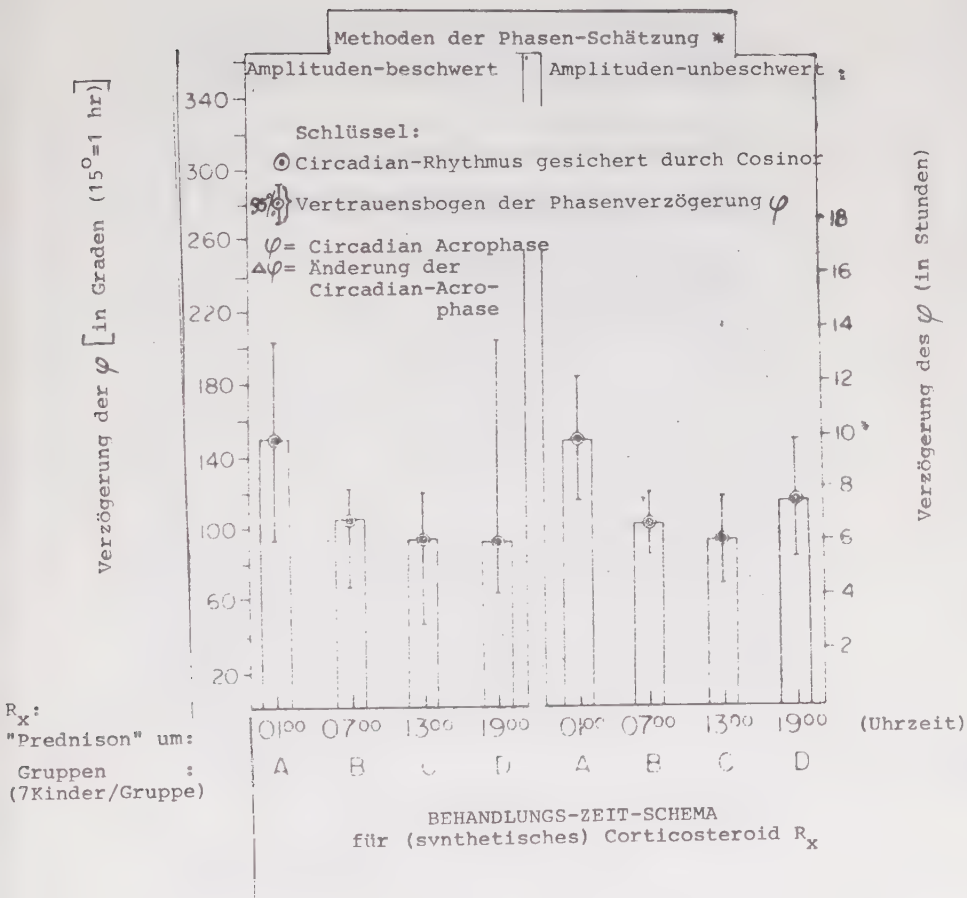


Abb. 43

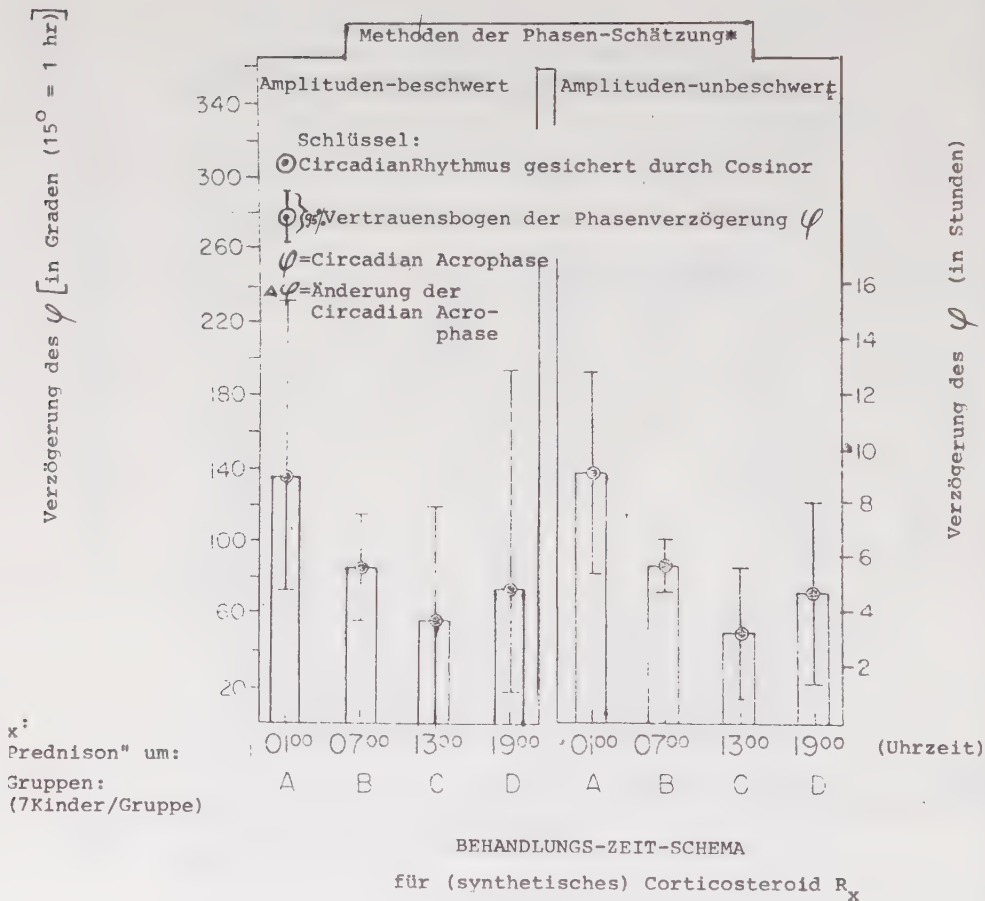
VERZÖGERUNG DER CIRCADIAN-ACROPHASE φ DES KALIUM-AUSSCHIEDUNGS-RHYTHMUS IM URIN BEZOGEN AUF DEN ZEITPUNKT DER TÄGLICHEN CORTICOSTEROID (R_x)-BEHANDLUNG



* Beide Ordinaten (Grade und Stunden) beziehen sich auf sämtliche Phasen Schätzungen

Abb. 44

VERZÖGERUNG DER CIRCADIAN-ACROPHASE φ DES CHLORID-AUSSCHIEDUNGSRHYTHMUS IM URIN BEZOGEN AUF DEN ZEITPUNKT DER TÄGLICHEN CORTICOSTEROID(R_x)-BEHANDLUNG.



* Beide Ordinaten (Grade und Stunden) beziehen sich auf sämtliche Phasen Schätzungen

aber ohne Corticosteroid nötig war, vorgezogen. Um den Prednisoneffekt auf den Kalium- und Chlorid-ausscheidungsrythmus im Urin auszuwerten, konnte lediglich der letztere Index (die interne Acrophase für Kinder mit mäßigem Asthma und geringer Behandlung, aber ohne Steroide) herangezogen werden.

Es muß nachdrücklich betont werden, daß ebenso wie beim PEFR-Rhythmus, die "Vorverschiebungen" und "Verzögerungen" der Urinausscheidungsrythmen von Kalium und Chlorid, wie sie hier angegeben sind, sich ausschließlich auf die Vergleiche zwischen Prednison-behandelten asthmatischen Kindern einerseits und einer Bezugsgruppe asthmatischer Kinder ohne Hormonbehandlung andererseits beziehen. Es wird hier also nicht die Phasenverschiebung per se diskutiert, sondern vielmehr auf den Unterschied der zeitlichen Acrophasenlage approximierter Funktionen hingewiesen (K, Cl), die erstens den Rhythmus corticosteroidbehandelter asthmatischer Kinder und zweitens einen Bezugsrhythmus in unbehandelten asthmatischen Kindern beschreiben.

Auswertungen der, vor Beginn und nach Beendigung der Studie durchgeführten Ganzkörperuntersuchung, der Röntgenaufnahmen der rechten Hand und des Handgelenkes sowie Glukosetoleranzteste, ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Medikationsgruppen.

DISKUSSION

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit erstreckten sich über mehrere Jahre und umfassen zwei Teilgebiete.

1. Die Studie rhythmischer Funktionen beim asthmatischen Kind und eine sich anschließende Prüfung der Cortison-Wirkung auf den Rhythmus und die Abhängigkeit von einer circadianphasenbezogenen Applikation.
2. Die Studie einer circadianphasenabhängigen Hormongabe in vergleichbarer Form zu Teil 1 bei der Maus.

ad 1

Die Ergebnisse der Vorstudie bei Kindern mit abgeklungenem, mäßigem und schwerem, steroidabhängigem Asthma stellen zusammen mit den Resultaten der Arbeit von Halberg und Falliers (1966b) den ersten Schritt zu einer Corticosteroid-Zeit-Therapie dar. Wurden von Halberg et al. Circadian-Phasen-Diagramme für Rektaltemperatur, Puls, Urinvolumen und 17-OHCS-Ausscheidung bei Gesunden sowie symptomlos- und behandlungsfreien asthmatischen Kindern aufgestellt, so wurden jene Diagramme in dieser Arbeit verglichen mit den Ergebnissen von "Rapid Remitters" und ergänzt durch Phasen-Diagramme für Ausatemstoß-Werte (PEFR) bei der gleichen Gruppe und bei Kindern mit mittlerem und schwerem Asthma.

Stellt man die durch elektronische Rechenverfahren ermittelten Acrophasen und Vertrauensbögen der Rektal-

temperatur für die nach Alter und täglichem Lebensrhythmus vergleichbaren Gruppen von Kindern mit unterschiedlichem Gesundheitszustand zueinander in Beziehung, so zeigt es sich, daß bei allen Gruppen ein Circadian-Rhythmus dieser Funktion vorlag, und die am Morgen verabreichte Steroidmenge der dritten, schwer asthmatischen Gruppe die Acrophase der Temperatur ebenfalls nicht grob verändert.

Die in der Vorstudie erhaltenen PEFR-Circadian-Phasen-Diagramme für die drei untersuchten Gruppen asthmatischer Kinder können verglichen werden mit den Polarphasen-Diagrammen der gleichen Funktion bei einem gleichaltrigen, gesunden Mädchen (Halberg et al., 1967 b). Die 1964 in einer Längsschnitt-Studie über mehrere Monate aufgezeichneten Ausatemstoß-Werte dieses Mädchens wurden erstmals zur Ermittlung eines Rhythmus nach der Cosinor-Methode ausgewertet und sind in Abb. 45 wiedergegeben. *)

*) Als ersten Versuch, eine rhythmische Veränderung der Atmung festzustellen, darf man wohl die von Jores (1935) zitierten Untersuchungen des Gujer (1928) werten, "der mit einem Pneumotachographen die Geschwindigkeit der Ausströmung der Atemluft gemessen hat und dabei findet, daß die Atmung im Schlaf charakterisiert ist durch niedrigere Frequenz bei größerer Atemtiefe und größeren Atempausen."

Er stellt dann die Frage, ob die Änderung in der Atmung ein echter Rhythmus oder eine Folge des Schlafes ist und zieht nach den Untersuchungen von Straub (1915) den Schluß, daß es wohl letzteres sei, da mit dem Schlaf eine Änderung der Erregbarkeit des Atemzentrums vollzogen wird. Die Frage, ob es einen echten Rhythmus im Verhalten der Atmung gibt, muß offenbleiben.

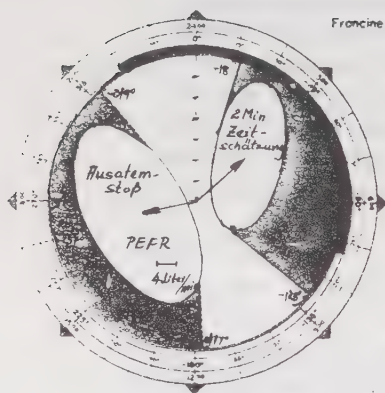
Menzel (1958) beschreibt vor über 25 Jahren Tag-/Nachtschwankungen der Pneumometerwerte beim Asthmiker.

Abb. 45

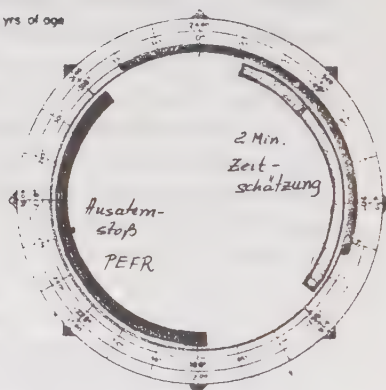
(entnommen aus Halberg et al., 1967)

ACROPHASEN DES AUSATEMSTOSSES PEFR-UND ZEIT-
SCHÄTZUNGS-RHYTHMUS

Cosinor



Polar-Phasen-Diagramm



Cosinor-Ergebnisse einer Reihe von Aufzeichnungen
(PEFR und Zeitschätzung: 113 Daten über 41 Tage)
bei einem gesunden, 12 1/2 jährigen Mädchen.

Analog den Ergebnissen bei der Rektaltemperatur ist auch beim Ausatemstoß für alle drei Gruppen ein Überlagern der Phasenvertrauensbereiche festgestellt worden.

Als wesentlicher Gesichtspunkt der ersten Querschnitts-Studie galt der prinzipielle Ausschluß einer circadianen Desynchronisation des Atemstoßes, wie er bei der Mehrzahl der Kinder in den untersuchten Gruppen gegeben war. Damit war erst die Voraussetzung geschaffen, daß die nachfolgende Therapie-Studie mit ihren verschiedenen Medikationszeiten Circadian-System-Phasen- und nicht nur Tageszeit-bezogen war (Reindl, 1967).

Nach der Kenntnis unterschiedlicher Wirksamkeit verschiedener chemischer Agentien, bezogen auf das circadiane System der Tierorganismen (Haus und Halberg, 1959; Halberg 1960a, Halberg et al., 1958 b, 1960a) und nach den Erfahrungen von Reinberg (1965a,b) und Reinberg et al. am Menschen, wurde erstmals bei schwer asthmatischen, steroidabhängigen Kindern der Effekt der Methylprednisolon-Applikation zu vier verschiedenen Circadian-System-Phasen (01.00, 07.00, 13.00 und 19.00) geprüft.

Es galt einmal, die möglicherweise unterschiedlich verstärkten oder abgeschwächten Nebenwirkungen der Cortison-Therapie, wie sie durch äußere Symptomatik zu erkennen sind, zu erfassen und zweitens, unterschiedliche Wirkungen und Nebenwirkungen der Behandlung, wie sie sich durch Veränderung der Rhythmenstruktur des Systems als Ganzes oder durch Phasenverschiebung circadianrhythmischer Funktionen manifestieren, zu analysieren.

Auf der Suche nach dem "tempus minoris resistantiae" korrespondierend zum locus minoris resistantiae" (Halberg et al., 1958b) wurden die Erfahrungen, wie sie durch Cortisonstudien am Tier und teilweise auch am

Menschen gewonnen werden konnten, auch besonders in ethischer Hinsicht sehr ernst diskutiert. Aus Arbeiten von Tarquini et al. (1966) und Retiene et al. (1967 b) bei der Ratte und Studien von Di Raimondo et al. (1956, 1958) Grant et al. (1965); Scalabrino et al. (1967), Schulz et al. (1971) am Menschen geht hervor, daß zum Zeitpunkt höchster Corticosteroidausscheidung im Urin, ein Maß für höchste Nebennierentätigkeit, exogen zugeführtes Cortison eine geringste Suppression der Nebenniere hervorruft.

Auch Retiene et al. (1967a) haben vorgeschlagen, daß bei Langzeitbehandlung mit Corticosteroiden beim Menschen die Medikation nur einmal am Tag und zwar frühmorgens erfolgen soll. In einer Reihe von Originalarbeiten (Harter, 1966; Thorn, 1966) wurde eine bestimmte Tageszeit (morgens) für die Cortisonbehandlung der Asthmatiker angegeben. Dies war jedoch als klinische Erfahrung ohne Bezug auf eine durch Rhythmometrie ermittelte Circadian-System-Phase zu werten.

In seiner Arbeit "Klinische Überlegungen bei der Verwendung von Corticosteroiden" stellt Thorn (1966) die Vermutung auf, daß bei Störung des "diurnalen Musters" im Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierensystem mit physiologisch hohen ACTH- und Steroid-Werten in den frühen Morgenstunden eine signifikante Prädisposition für Cushing-Syndrom gegeben sei und die Ursache in erhöhten Steroidwerten während der Nacht zu suchen ist.

Im Hinblick auf diese Überlegung wurde bei der erstmals am schwer asthmatischen, seit langer Zeit steroidabhängigen Patienten durchgeführte Hormonempfindlichkeits-Studie ganz besonderes Augenmerk auf die durch Störungen im Fettstoff-Wechsel Kuschinsky et al. (1967) verursachten Nebenwirkungen (Mondgesicht und Stiernacken) gerichtet.

Zur Auswertung der, in manchen Fällen durch die Vorbehandlung mit Cortison (über einen langen Zeitraum täglich um 8.⁰⁰) ohnehin unterschiedlich stark ausgeprägten cushingoiden Gesichtszüge, wurde vor Beginn und nach Beendigung der Cortison-Zeit-Behandlung unter standardisierten Bedingungen das Gesicht photographiert.

Die Beurteilung der Farbdiaspositiva wurde von mehreren Personen in Denver, Minneapolis und München durchgeführt, wobei jedoch von den Aufzeichnungen für die verschiedenen Therapie-Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden werden konnten.

Zur Bewertung unterschiedlicher Wirksamkeit von Circadian-System-Phasen bezogenem verabreichtem Prednison konnte der Ausatemstoß gewählt werden, der, wie in der Vorstudie nachgewiesen wurde, im Vergleich zu gesunden Kindern und "rapid remitters" auch bei steroidabhängigen asthmatischen Kindern einen Circadian-Rhythmus zeigt.

Stellt man die im vorausgehenden Kapitel im Detail beschriebenen Ergebnisse der PEFR-Analysen der einzelnen Gruppen zueinander in Beziehung, so wird deutlich, daß bei der 07.⁰⁰-Gruppe eine Verbesserung des PEFR-Wertes vorlag. Die anderen Therapie-Gruppen (01.⁰⁰, 13.⁰⁰ und 19.⁰⁰) zeigten unterschiedliche prozentuale Änderungen (Abb. 39). Wieweit die in unmittelbarer Nähe des physiologischen Gipfels der circadian-rhythmischen Funktion der Nebenniere bei Gruppe B verabreichte Steroidgabe eine geringste Störung und damit größte kurative Wirkung zeigte, bleibt zunächst offen, da die Änderung des Medikations-Index für die gleiche Zeitgruppe einen Anstieg erkennen läßt. Stellt man aber (rechte Hälfte der Abb. 39) die Überlegung an, daß sich im Zwischengruppenvergleich eine Änderung im

Medikations-Index durch relative Zunahme nur unwesentlich auswirkt, da sich die Vertrauensbereiche für alle 4 Behandlungsgruppen überlappen, so kann in diesem Licht für die Gruppe B eine geringe Verbesserung des Asthmaleidens angenommen werden.

Vergleicht man ferner (Abb. 39) die verminderte prozentuale PEFR-Änderung für die Gruppen A (01.⁰⁰) und C (13.⁰⁰) im Gegensatz zu B (07.⁰⁰) und D (19.⁰⁰), so scheint dieses Phänomen mit den Zeiten verminderter Nebennierentätigkeit zu korrespondieren. Es ist bekannt, daß nach einer Aktivitätsverminderung der Nebenniere am späten Vormittag nochmals eine geringe Aktivitätszunahme gegen Nachmittag folgt (Knapp, 1967; Halberg, 1953).

Betrachtet man die PEFR-Phasenverschiebungen der einzelnen Gruppen, so stimmt im Gegensatz zur Tachyphase um 13.⁰⁰ die iatrogen induzierte Bradyphase für 01.⁰⁰ und nach nicht amplitudenbeschwerter Auswertung auch für 19.⁰⁰ mit dem oben diskutierten insofern überein, als die PEFR-Acrophase der Gruppe 07.⁰⁰ zum Zeitpunkt der Acrophase des endogenen Plasma-17-OHCS-Rhythmus grob unverändert blieb (Abb. 40).

Aus Untersuchungen von Halberg (1967b) und Kanabrocki et al. (1974) sind beim gesunden Menschen circadiane Kalium- und Chlorid-Urinausscheidungsrythmen bekannt. Außerdem weiß man von pathologisch gesteigerter Natrium-Retention und Kaliumausscheidung (Kuschinsky, 1967) bei Glucocorticosteroid-Langzeit-Therapie. Es erhebt sich nun die Frage nach einer chronopathologischen Veränderung der normalerweise circadianrhythmischen Kaliumausscheidung. * Die Urinausscheidungsrythmen der in den einzelnen Gruppen zu allen Medikationszeiten untersuchten Elektrolyte, Kalium und Chlorid, waren

* Dabei ist natürlich zu berücksichtigen, daß Solu Medrol (ein synthetisches Corticosteroid) nur geringen Einfluß auf den Wasser- und Mineralhaushalt ausübt.

synchronisiert. Dabei waren aber unterschiedliche Phasenverschiebungen (Abb. 41, 42) zu beobachten, die in etwa mit den Phasenverschiebungen der PEFR-Acrophase korrespondieren.

ad 2

Die Ergebnisse der Untersuchungen an $\pm$ C-Mäusen zeigen circadianrhythmische Empfindlichkeitsreaktionen auf Solu Medrol, einem Methylprednisolon. Dieses Präparat wurde für die tierexperimentellen Untersuchungen gewählt, um gegenüber der Cortison-Studie bei asthmatischen Kindern einen gewissen chronopharmakologischen Reaktionsvergleich anstellen zu können.

Ziel der Cortison-Zeit-Behandlung von Mäusen war es, im Vergleich zu den in der Literatur von Tarquini et al. 1966) und Retiene et al. 1967b) für Dexamethason angegebenen circadian-rhythmischen Wirkungsunterschiede auf die Nebenniere denselben für Methylprednisolon zu testen und darüberhinaus eine mögliche Circadian-System-Phasen-Abhängigkeit verschiedener Nebenwirkungen zu ermitteln.

Aufgaben der Vorstudien waren:

1. Ein Material zu finden, das die antiinflammatorische Wirkung von Cortison durch Verminderung einer Granulombildung deutlich demonstrieren läßt, und
2. in einem Dosiswirkungsversuch verschiedene Dosen Methylprednisolon (0,1 μ g bis 10 mg) auf ihre

eiweißkatabole, gewichtsreduzierende Wirkung hin zu testen, wie sie durch Untersuchungen am Tier und am Menschen aus der Literatur bekannt ist (D'Aqata et al., 1968; Metre et al. 1959; Mimi et al. 1964).

Ein Lebergewichtvergleich bei verschiedenen Dosen sollte neben dem Vergleich anderer Organgewichte (Nebenniere und Milz) vor allem die erhöhte Leberglycogen-Speicherpotenz von Cortison im Zusammenhang mit der allgemeinen Wirkung auf den Kohlehydratstoffwechsel herausstellen (Silber, 1959).

Den Arbeiten von Silber (1959) und Silber et al. (1970) ist zu entnehmen, daß die Granulombildung bisher bei Ratten durch implantierte Baumwollkugeln (Robert und Mezamis, 1957) angeregt und Reaktionsunterschiede durch Gewichtsvergleich der entfernten und anschließend getrockneten Granulome erhalten wurde.

Um zur Ermittlung rhythmusabhängiger Unterschiede der Granulomhemmwirkung durch Methylprednisolon ein optimales Material zu finden, wurden verschiedene Gewebe getestet, von denen Balsaholz die beste Reaktion zeigte. Die Auswertungen der gefärbten histologischen Schnitte durch ein photometrisches Verfahren werden in einer späteren Arbeit zusammengefaßt.

Diskutiert man die "makroskopisch" und "mikroskopisch" analysierten Ergebnisse der Rektaltemperatur für verschiedene Gruppen von vergleichbaren C-Mäusen, die LD (L: 07.00 - 19.00; D: 19.00 - 07.00) synchronisiert waren und unterschiedliche Dosen Solu Medrol erhalten hatten und setzt sie zu den makroskopisch ausgewerteten Organgewichten in Beziehung, so lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Wurde die Cortison-Dosis bei der dunkelaktiven Maus um den Zeitpunkt höchster Nebennierentätigkeit herum gegeben, so resultiert weder für die 1 mg noch für die 10 mg-Dosis eine Desynchronisation des Circadian-Rhythmus (Abb. 21).
2. Die im Chronogramm (Abb. 21) bei der 10 mg-Dosis gegenüber der Kontrollgruppe A und der 1 mg-Dosis als statistisch signifikant ($P < .01$) erkennbare Phasenverschiebung der Rektaltemperatur um nahezu 180° deutet auf einen chronopathologischen Effekt hin, der durch eine zu dieser Circadian-Phase verabreichten Steroid-Menge verursacht wurde.

Die 10 mg-Corticosteroid-Dosis induzierte bei unverändertem Licht-Dunkel-Synchronisator nahezu eine Temperaturphaseninversion. Möglicherweise steht dieses Phänomen in unmittelbarem Zusammenhang mit der Dosishöhe, die mit 10 mg bei der Maus wohl die Grenze des Tolerierbaren erreicht hatte (am 5. Tag nach Beginn der Injektion war bei dieser Dosis-Gruppe ein Tier tot aufgefunden worden).

Da die Acrophase des Rektaltemperatur-Rhythmus für die 1 mg-Dosis-Gruppe in Phase blieb mit der für die Kontrollgruppe A, scheint zu diesem für beide Gruppen gleichem Circadian-Phasen bezogenem Applikationszeitpunkt keine chronopharmakologische Wirkung auf die Temperatur zu bestehen.

3. Die bei "mikroskopischer" Temperaturanalyse deutlich werdende Wirkungsintensität der 10 mg-Dosis läßt sich für diese gleiche Versuchsgruppe auch bei "makroskopischer" Auswertung der Organgewichtskurven erkennen.

Eine durch Cortisonmedikation hervorgerufene Hemmwirkung auf das lymphatische System wurde durch Milzgewichtsreduktion angezeigt. Blieben nach 8tägiger Behandlung mit der 1 mg-Dosis die Verlaufskurven von Nebennieren- und Lebergewicht unverändert, so resultierte beim Milzgewicht gegenüber den Kontrolltieren eine statistisch signifikante Abnahme (Abb. 15).

Tarquini et al. 1966) und Retiene et al. (1967b) beschrieben für Dexamethason eine minimale Nebennierenatrophie und Corticosteron-Ausscheidungs-Verminderung, wenn das Hormon zum erwartet höchsten täglichen Serum-Corticosteron-Konzentrationsgipfel appliziert wurde. Betrachtet man in dieser Vorstudie eine Nebennierengewichtsveränderung als repräsentativ für zunehmende Organatrophie, so kann man übereinstimmend mit der Literatur sagen, daß bis zu 1 mg Solu Medrol, gegeben um 17.00 ± 30 Min., keine wesentliche Nebennierengewichtsatrophy auftritt.

Die in der Hauptstudie bei unterschiedlicher Circadian-System-Phasen bezogener Applikationszeit untersuchte Solu Medrol-Empfindlichkeitsreaktion wurde von zwei Aspekten betrachtet.

1. Zeigt die Circadian-Rhythmus-bezogene Behandlung mit Cortison einen desynchronisierenden Effekt ?
2. Welcher Wirkungsunterschied zwischen Kontroll- und Cortison-behandelten Tieren kann bei einzelnen Funktionen zu unterschiedlichen Circadian-Phasen gefunden werden ?

Bisher wurden in Klinik und Praxis bei verschiedenen Krankheiten lediglich nach Empirie Cortison appliziert. Eine möglicherweise unterschiedliche Zeitstruktur des Organismus wurde dabei wenig oder gar nicht berücksichtigt.

Menzel war 1941 wohl einer der ersten, der ernsthaft einen täglichen Empfindlichkeitsrhythmus am Menschen studierte. Bei zwei hospitalisierten Patienten, einem Cushing-Syndrom und einem Neuraasteniker, wurden identische Atropin-Dosen zu verschiedenen Uhrzeiten in ihrer Wirkung auf die Vitalkapazität geprüft.

In einer Reihe weiterer Untersuchungen haben mehrere Autoren im Tierorganismus einen Reaktions- und Empfindlichkeits-Rhythmus auf verschiedene chemische Substanzen nachgewiesen.

Neben den weiter oben angegebenen Studien relativer Wirkungsunterschiede synthetischer Corticosteroide auf die Nebennierenfunktion (wenn das Präparat zu verschiedenen Uhrzeiten gegeben wurde) waren die Arbeiten von Martin et al. (1964) für die Ergebnisse dieser Arbeit von besonderer Bedeutung.

Martin et al. beschrieben verschiedene Gruppen männlicher Versuchspersonen, denen zu unterschiedlichen Circadian-System-Phasen des Nebennierenrindensekretions-Rhythmus ACTH infundiert wurde.

Die 17-OHCS-Konzentration im Urin der Versuchspersonen wurde am Ende der Studie bestimmt und dabei Veränderungen des Amplituden-Niveaus C_0 , der Amplitude C und der Acrophase der 17-OHCS-Ausscheidung gefunden. ACTH bewirkte in allen Gruppen, verglichen mit den Kontrollen, ein höheres C_0 und C.

Während der Circadian-Phase der erwartet höchsten 17-OHCS-Ausschüttung (zwischen 04.00 und 08.00 oder zwischen 12.00 und 18.00) wurde im Vergleich zu den Kontrollen ein etwa 3facher Anstieg des C_0 und etwa 4-5facher des C-Wertes erreicht. Während eine ACTH-Infusion von 04.00 bis 08.00 keine Acrophasenänderung hervorrief (der Unterschied zwischen dem $\emptyset$ dieser Gruppe -175° und dem der Kontrolle $-172^\circ = 3^\circ$), ergab eine Infusion von 0.00 bis 06.00 eine positive Acrophasenverschiebung auf -122° . Infusionen in gleicher Weise von 12.00 bis 18.00 oder ähnlich von 16.00 bis 20.00 verschoben die Acrophasen im negativen Sinn.

Eine ACTH-Infusion von 16.00 bis 20.00, die im Gegensatz zu der von 04.00 bis 06.00 (offenbar entspricht diese Zeit der höchsten endogenen ACTH-Sekretion) steht, resultierte in einer etwa 180° -Phasenverschiebung des 17-OHCS-Rhythmus, was sich als Acrophasenänderung von -172° auf -348° erweist.

Die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit sind in mancher Hinsicht mit den von Martin et al. 1964) beim Menschen und den von Haus und Halberg (1962) bei der Maus berichteten Resultaten vergleichbar (s. Literaturübersicht).

Lebergewicht- und Leberglykogengehalt

Gleichwohl für das Lebergewicht der cortisonbehandelten Versuchsgruppen im Vergleich zu den Kontrollen eine Desynchronisation, Abb. 24 des Circadianrhythmus verzeichnet werden mußte, war durch die Medikation in der Leberglykogen-Speicherfunktion keine wesentliche Änderung zu erkennen. Abb. 28

Sowohl für die Kontroll- als auch für die cortison-behandelten Tiere wurde durch die Cosinor-Methode ein Circadian-Rhythmus $P = .001$ nachgewiesen. Es wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, daß das Ausmaß der Leberglykogen-Speicherung Circadian-System-Phasen abhängig ist.

Injektionen von exogenem Cortison (Solu Medrol) um $17^{00} \pm 30$ Min. verursachten einen erheblich geringeren Unterschied der Leber-Glykogen-Speicherung zwischen Versuchstieren und Kontrollen als bei gleichen Dosen zwischen 05^{00} und 09^{00} zum Zeitpunkt niedrigster Nebennierentätigkeit bei der Maus.

Der prozentuale Abfall des Leber-Glykogen-Gehaltes war am geringsten zum erwartet höchsten Nebennieren-aktivitätsgipfel um 17^{00} und 01^{00} . Der 01^{00} -Zeitpunkt würde in etwa mit einem zweiten physiologischen Aktivitätsgipfel der Nebenniere zusammenfallen.

Die Dokumentation eines Leber-Glykogen-Konzentrationsrhythmus bei den Kontrollen bestätigt frühere Ergebnisse von Potter et al. (1966), Halberg et al. (1960a) und Haus et al. (1966 b, 1969).

In der Literatur wird bei Licht-Dunkel-synchronisierten Tieren (L: 06.00 bis 18.00; D: 18.00 bis 06.00) das Maximum der Leber-Glykogen-Speicherung um ungefähr 20.00 beschrieben (Barnum, 1958).

Die im Vergleich dazu bei Cortison behandelten Tieren in dieser Studie beschriebene unterschiedliche Leber-Glykogen-Speicheraktivität mit größter Verringerung durch Cortisonapplikation um 05.00 und geringster um 17.00 stimmt mit den Ergebnissen einer späteren Arbeit von Smolensky et al. (1971) überein. In jener Studie wurden C-Mäuse mit wesentlich höheren Methylprednisolon-Dosen (MP; 4 mg und 8 mg/20 g Körpergewicht) bei einem LD-Synchronisator (von L:06.00 bis 18.00) zu vergleichbaren unterschiedlichen Circadian-Phasen behandelt. Eine Applikation von 8 mg MP um 04.00 resultierte im Vergleich zu den Kontrollen in einer circadianen Amplituden(C)-Reduktion des Leber-Glykogen-Gehalts um das einhalb- oder mehrfache.

Bei Betrachtung der Leber-Glykogen-Konzentrationskurven stellt sich im Gegensatz zu der erwartet verstärkten cortisonbedingten Glukoneogenese bei den Versuchsgruppen eine Verminderung derselben dar. Vergleicht man in diesem Zusammenhang die Organgewichtskurven aus der Vorstudie, so wird deutlich, daß für den gleichen untersuchten Zeitraum bei der Leber hinsichtlich der Dosen 0,1 µg bis 1 mg Cortison kein wesentlicher Gewichtsniveau-Unterschied vorliegt. Erst die 10 mg-Dosis verursachte eine exzessive Gewichtserhöhung. Eine Leber-Glykogen-Konzentrationszunahme wurde für größere Dosen als 1 mg Methylprednisolon auch von Smolensky et al. (1971) berichtet.

Milzgewicht

Die in der Literatur bisher offenbar unbekannte Circadian-Phasen abhängige Wirkung von Cortison auf das lymphatische System wird in dieser Arbeit gezeigt. Als Indikator der Cortison-Hemmwirkung wurde die Milzgewichtsverminderung gewählt. Für Kontroll- wie auch Versuchsgruppen läßt sich im Chronogramm, Abb. 26, ein Circadian-Rhythmus erkennen. Durch Methylprednisolon wurde eine Acrophasenverschiebung um über 90° erreicht. Vergleicht man die Gruppenunterschiede zwischen Kontroll- und Versuchstieren zu den einzelnen Circadian-Phasen bezogenen Medikationszeiten, Abb. 25, so wird eine phasenabhängige Unterschiedlichkeit der Hemmwirkung deutlich.

Es gibt Circadian-Phasen, zu denen durch die Medikation eine geringste Milzgewichtsreduktion gegenüber den Kontrollen (um 21^{00}), und andere (um 09^{00}), zu denen eine größte Reduktion verzeichnet wurde. (Abb. 25).

Vergleicht man die graphischen Darstellungen von Abb. 29 und Abb. 25 miteinander, so wird für beide Kurven ein ähnlicher Verlauf erkennbar.

Dem geringsten Unterschied der Leber-Glykogenkonzentration zwischen Kontrollen und Cortison-behandelten Tieren um 17^{00} steht im Vergleich zu dem Basiswert der durch die Kontrollen gebildet wird (21^{00}) die geringste Milzgewichtsreduktion gegenüber. Es fällt dabei auf, daß letzteres Phänomen 4 h gegenüber dem vorigen verschoben ist.

Serum- und Nebennierencorticosterongehalt

Der, zu den verschiedenen Medikationszeiten im Serum und der Nebenniere für die einzelnen Gruppen von Kontroll- und Versuchstieren ermittelte Corticosterongehalt demonstriert deutlich eine iatrogen induzierte Hemmwirkung auf die Funktion der Nebenniere. Dieser Effekt trat unterschiedlich stark auf. Wurde Solu Medrol um den Zeitpunkt der erwartet höchsten Nebennierentätigkeit appliziert, so resultierte keine Einschränkung der Nebennierensekretion.

Zu allen anderen Testzeiten zeigte sich jedoch eine verschieden starke Reduktion der Corticosteronausscheidung.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Tarquini et al.(1966) über die Circadian-System-Phasen abhängige Hemmwirkung von Dexamethason auf den Nebennierenausscheidungsrythmus können die unterschiedlichen Empfindlichkeitsreaktionen der Nebenniere auf Methylprednisolon im einzelnen diskutiert werden.

24 Stunden nach der letzten (8.) Injektion, (Abb. 20), wurden die Mäuse der verschiedenen Applikationszeit-Gruppen ϕ_1 zur Circadianphase ϕ_T , die in der Uhrzeit mit ϕ_1 übereinstimmte, getötet. Die gruppenweise analysierten Corticosteronkonzentrationen für Kontroll-(C) und Versuchstiere (E) wurden miteinander verglichen, (Abb. 32, 33).

Eine prozentuale Verminderung des Hormongehaltes sowohl im Serum, (Abb. 32) als auch in der Nebenniere (Abb. 33), errechnet nach der Formel $(1 - \frac{E}{C}) \cdot 100$,

war am größten bei den Mäusen der 01⁰⁰-Gruppe. Es ist zu bemerken, daß die Nebennierensuppression wenigstens 24 h nach der letzten Corticosteroid-Injektion anhielt. Nahezu kein Unterschied der beiden Kurven (Kontrolltiere versus Versuchstiere) war um den Zeitpunkt der circadianen Acrophase (etwa 17⁰⁰ bei Licht-Dunkel-Synchronisation L: 07⁰⁰ bis 19⁰⁰) zu sehen.

Im Vergleich dazu war das Ausmaß corticosteroid-induzierter Nebennierenatrophie statistisch signifikant größer für diejenige Mäusegruppe, die während der Phase erwartet verminderter Nebennierensekretion mit Cortison behandelt wurde.

Setzt man abschließend die Ergebnisse der Cortisonstudie bei asthmatischen Kindern zu denen aus der eben diskutierten Mäusestudie in Beziehung, so kann man folgende Überlegungen anstellen.

Die, durch verschiedene Parameter wie Kalium- und Chlorid-Ausscheidung im Urin bei asthmatischen Kindern repräsentierte Nebennierenfunktion, zeigte ein circadianrhythmisches Verhalten. Durch eine unterschiedlich Circadian-System-Phasen bezogene Cortisonapplikation wurde dieser Rhythmus in seiner Phasenlage verändert. Unabhängig von den Auswertungen der PEFR-Rhythmus-Untersuchungen kann gesagt werden, daß um den Zeitpunkt des, bei asthmatischen Kindern erwarteten physiologischen Nebennierenaktivitäts-Gipfels eine geringste Veränderung des Kalium- und Chlorid-Ausscheidungsrythmus auftrat, zu den anderen Medikationszeiten hingegen erhebliche Phasenverschiebungen zu sehen waren. Als Parallele kann man im vorliegenden Tierversuch einmal die Ergebnisse der Nebennierensuppression werten, wie sie durch die Serum- und Organ-

corticosteron-Konzentration wiedergegeben wird und zum anderen die, durch unterschiedlich Circadian-System-Phasen bezogene Cortison-applikation verursachte Leber-Glykogen-Speicheraktivität und Milzgewichtsreduktion. Resümierend kann man für die beiden letzten Funktionen eine geringste Veränderung dann finden, wenn Cortison um den Zeitpunkt des, für die Maus erwartet höchsten Nebennierenaktivitäts-Gipfels gegeben wurde, wobei im Vergleich zur geringsten Glukoneogenese-Reaktion die Acrophase der Hemmwirkung auf das lymphatische System (ausgedrückt durch Veränderungen des Milzgewichts) 4 h später lag .

Die Auswertungen der Granulombildung am Balsaholz lassen vermutlich weitere vergleichende Aussagen zu.

Zusammenfassung und Schlußgedanke

Die vorliegende Arbeit beschreibt zunächst klinische Untersuchungen.

An 40 Kindern mit chronischem, zum Teil steroid-abhängigem Bronchialasthma, wurde durch Cortison-gabe am Morgen die Acrophase sowohl des circa-dianen Temperatur- als auch des Ausatemstoß-rhythmus (PEFR) nicht grob verändert.

Untersuchungen an 28 steroidabhängigen schwer asthmatischen Kindern, bei denen in einer Cortison-Langzeituntersuchung gezeigt werden konnte, daß Prednison, zu verschiedenen Phasen des Circadian-Systems gegeben, unterschiedliche Wirkungen aufwies. Wurde das Medikament täglich um 07.00, d.h. zur Acrophase des endogenen Serum-17-OHCS-Rhythmus oder in der Nähe dieser Acrophase gegeben, so blieb die Acrophase des Ausatemstoßrhythmus nahezu unverändert. Eine tägliche Cortisongabe um 13.00 rief eine statistisch signifikante Verschiebung der Acrophase der Ausatemstoß-Circadian-Periodik hervor, die

im Gegensatz zur Phasenverschiebung oder -beschleunigung bei Applikationszeiten um 09.00 und 19.00, in einer Phasenverzögerung bestand.

Die Circadian-Periodik der Kalium- und Chlorid-ausscheidung im Urin war durch Prednison ebenfalls einer Phasenverschiebung unterworfen.

Bei den Untersuchungen der Circadian-System-Phasen bezogenen Medikationswirkung konnten für die Applikationszeit um 07.00 gegenüber den anderen drei Testzeiten (01.00, 13.00, 19.00) eine geringe Besserung und vermutlich geringere Nebenwirkungen, dokumentiert durch Ausatemstoßmessungen, erzielt werden.

Weiterhin werden tiereperimentelle Untersuchungen mit Methylprednisolon an insgesamt 179 weiblichen C-Mäusen beschrieben.

Cortison zeigte auch beim Tier Circadian-System-Phasen abhängige Wirkungsunterschiede. Wurde das Medikament zur erwarteten Acrophase der physiologischen Nebennierenaktivität, bei der dunkelaktiven Maus um 17.⁰⁰ (1:07.⁰⁰ bis 19.⁰⁰), gegeben, so resultierte eine geringste Nebennierensuppression.

Zu anderen Tageszeiten zeigten sich unterschiedlich starke Verminderungen des Serum- und Nebennierencorticosterongehaltes.

Eine Desynchronisation des Circadian-Rhythmus des Milzgewichtes und der Leber-Glykogen-Konzentration wurde durch die verschiedenen Circadian-System-Phasen bezogenen Hormonapplikationen nicht gesehen, gleichwohl für erstere Funktion eine Phasenverschiebung eintrat. Ein geringster Unterschied der Leber-Glykogen-Konzentration war im Vergleich zwischen Versuchs- und Kontrolltieren um 17.⁰⁰, der geringste Milzgewichtsunterschied gegen 21.⁰⁰ zu verzeichnen.

Die Tierstudien deckten auf, daß Cortison zu verschiedenen Circadian-Phasen appliziert, verschieden starke Wirkungen und Nebenwirkungen zeigte.

Aus den klinischen und tierexperimentellen Untersuchungen läßt sich schlußfolgern, daß vor allem bei notwendiger Langzeitbehandlung Cortison um den Zeitpunkt höchster Nebennierenaktivität den besten kurativen Effekt und die geringste Nebenwirkungsrate erwarten läßt. Zu anderen Zeitpunkten muß eine "interne Desynchronisation, wie sie durch eine Medikamenten-induzierte Phasenverschiebung verursacht werden kann" (Schewing et al., 1973), in Betracht gezogen werden.

Erläuterungen und Definitionen

"Chronobiologie": In der "Chronobiologie" werden Untersuchungen zeitlicher Aspekte biologischer Vorgänge durchgeführt. Ein chronobiologisches Verfahren stellt die Sammlung und Analyse (Rhythmometrie) von Zeitreihen dar. Je nach dem Ziel der rhythmometrischen Untersuchung kann man von Chronophysiologie, Chronopathologie, Chronopharmakologie oder Chronotoxikologie sprechen.

Bei einer auf die Zeitstruktur bezogenen Therapie kann es sich um Chronotherapie handeln.

Der Ausdruck "Periodizität" wird für regelmäßige, wiederholbare Änderungen, wie sie in der belebten und unbelebten Natur vorkommen, gewählt.

Eine "periodische Funktion" ist eine Funktion, deren Wert in regelmäßigen (zeitlichen oder räumlichen) Abständen, entsprechend einer Periode, τ wiederkehrt.

$$f(t) = f(t + \tau)$$

Eine "Zeitreihe" ist die Folge von Wertepaaren t und y_t , wobei t die Zeit und y_t eine zum Zeitpunkt t gemessene Größe ist.

Eine "kontinuierliche Zeitreihe" bezeichnet eine "Zeitreihe" mit kontinuierlich - über eine gesamte zu analysierende Beobachtungsspanne (T) - gegebenen t und y_t .

Unter "diskreter Zeitreihe" versteht man eine "Zeitreihe" mit in gleichen oder ungleichen (positiven) Abständen (Δt) vorliegenden Wertepaaren $y_t + t$.

Das "Mittel $\bar{x}$ " ist das arithmetische Mittel zweier oder mehrerer Zahlen; gleich der Summe der Zahlen geteilt durch ihre Anzahl.

Unter "Periode τ " versteht man einen regelmäßigen durchschnittlichen Abstand, nach welchem sich bestimmte Veränderungen gleichsinnig wiederholen.

"Frequenz f " ist die Durchschnittszahl der Perioden in der Zeiteinheit; $f = \frac{1}{\tau}$.

Als Einheit dient üblicherweise die Zahl von Perioden pro Sec. (= Hertz; Hz).

"Kreisfrequenz ω " ist die mit zwei π multiplizierte Frequenz einer Cosinusfunktion. Bei Kreisbewegungen ist ω gleich der Winkelgeschwindigkeit.

Unter "Rauschen" (Noise) versteht man "Zufallseinflüsse im weitesten Sinn", die die rhythmischen Anteile einer Bioperiodik überlagern. Bei diesen Zufallseinflüssen sind alle nicht erkannten systematischen Meßfehler, sowie alle periodischen oder aperiodischen Variationen, die aus irgendeinem Grund (wegen der relativen Kürze T oder der relativen Länge von Δt) nicht erfaßt werden, mit inbegriffen.

Unter einer "synchronisierten Funktion" versteht man zwei oder mehr Funktionen der gleichen Frequenz, was nicht bedeutet, daß die beiden Funktionen keine Phasendifferenz aufweisen dürften.

"Synchronisierte Funktionen" können beschrieben werden durch ihre "internen Zeitgeber". Ein "externer Zeitgeber" beschreibt auf der anderen Seite das zeitliche Verhältnis eines gegebenen physiologischen Rhythmus in Bezug auf Zeitgeber eines beständigen Umweltbezugszyklus.

Wenn zwei oder mehr vorher synchronisierte Funktionen in ihrer Frequenz variieren, ist der Zustand einer "Desynchronisation" eingetreten. Wird dies durch einen Umwelttrhythmus erreicht, so spricht man von einer "externen Desynchronisation". Im Gegensatz dazu bezeichnet eine "interne Desynchronisation" eine Veränderung in der Phasenbeziehung zweier

oder mehrerer vorher synchronisierter Funktionen des gleichen physiologischen Systems.

In einem "mikroskopischen" Analyseverfahren werden durch eine "inferenzstatistische Methode" zeitliche Charakteristika von biologischem Rauschen (Noise) getrennt und objektive Endpunkte mit Vertrauensintervallen erhalten. Ein dabei entdeckter Rhythmus wird objektiv quantifiziert durch: die Periode τ , die Acrophase φ , die Amplitude C und das Niveau C_0 . Dies wird mit Hilfe des Computers durch "Kurvenanpassung" mit folgender Funktion erreicht:

$$f(t) = C_0 + C \cos(\omega t + \varphi)$$

wobei C_0 = Niveau, C = Amplitude, ω = Kreisfrequenz, t = Zeit und φ = Acrophase sind.

Das "Niveau" (C_0) ist ein Zeitreihendurchschnitt, wie er aus der den Rhythmus approximierenden Kurve entnommen wird. Bei Daten ungleicher Zeitabstände unterscheidet sich C_0 vom arithmetischen Mittel $\bar{x}$.

Unter "Acrophase" versteht man den höchsten Punkt der Kurve; sie wird angegeben in Grad und steht im Verhältnis ihres Phasenwinkels zu dem eines Bezugssystems.

Abhängig von der Art und der Zahl an Informationen können verschiedene Phasenbeziehungen gewählt werden, um die Acrophase eines gegebenen Rhythmus zu beschreiben. In gewissen Fällen kann ein willkürlich gewähltes Datum oder eine gewählte Uhrzeit als Phasenreferenz dienen. Wird die Acrophase auf einen z.B. geophysikalischen Synchronisatorzyklus bezogen, so wird sie als "externe Acrophase" φ bezeichnet. Eine durch Vergleich zweier Rhythmen derselben Frequenz physiologischer Funktionen des gleichen Organismus erhaltene Acrophase wird als "interne Acrophase" ϕ bezeichnet.

Abkürzungen

C	=	Amplitude
C _o	=	Niveau, Zeitreihendurchschnitt
t	=	Zeit
T	=	Gesamte Beobachtungszeit einer zu analysierenden Zeitreihe
Δt	=	Gleiche oder ungleiche Zeitabstände innerhalb einer Gesamtbeobachtungszeit (T)
f	=	Frequenz = Durchschnittszahl der Perioden in einer Zeiteinheit
ω	=	Kreisfrequenz = Frequenz einer Cosinusfunktion multipliziert mit 2π
$\bar{x}$	=	Arithmetisches Mittel
τ	=	Periode des biologischen Rhythmus
φ	=	Externe Acrophase = Phasenwinkel bezogen auf einen Synchronisator
$\Delta \varphi$	=	Betrag der Phasenverschiebung φ
$\emptyset$	=	Interne Acrophase = Phasenwinkel bezogen auf einen anderen Rhythmus gleicher Frequenz im gleichen Organismus
$\Delta \emptyset$	=	Betrag der Phasenverschiebung $\emptyset$
LD	=	Licht-Dunkel-Periode
L	=	Hellperiode
D	=	Dunkelperiode
DWS	=	Dosis-Wirkungs-Studie
SES	=	Solu Medrol-Empfindlichkeits-Studie
PEFR	=	Ausatemstoß (Engl.: <u>P</u> ea <u>k</u> <u>E</u> xpi <u>r</u> atory <u>F</u> low <u>R</u> ate)
MP	=	Methylprednisolon

Solu Medrol Empfindlichkeits-Studie (Maus)
 Serum-Corticosteron-Bestimmung (B)
 (nach Mattingly 1962 ; Turner 1964)

Röhrchen *	Proben	mlH ₂ O	Testmenge	50' F.J.	µgB	µg%
1	leer	2,5	O	-		
2	O,2 µgB	2,0	O,5	18		
3	O,6 µgB	1,0	1,5	53,5		
4	O,8 µgB	O,5	2,0	68		
5	E I	2,0	O,5	11	.135	13,5
6	E II	"	"	12	.13	13,0
7	E III	"	"	21	.235	23,5
8	E IV	"	"	20	.225	22,5
9	E V	"	"	9	.10	10,0
10	E VI	"	"	11	.135	13,5
11	K I	"	"	18	.20	20,0
12	K II	"	"	16	.18	18,0
13	K III	"	"	24	.27	27,0
14	K IV	"	"	26	.29	29,0
15	K V	"	"	17	.19	19,0
16	K VI	"	"	16	.18	18,0

F.J. = Fluoreszenz Intensität
 E = Versuchsgruppe
 K = Kontrollgruppe

* Alle Seren einer Zeitgruppe wurden gepoolt.
 Standardabweichungen können somit nicht angegeben werden.
 I = 9⁰⁰; II = 13⁰⁰; III = 17⁰⁰; IV = 21⁰⁰;
 V = 0⁰⁰; VI = 05⁰⁰.

Appendix-Tab.2

Solu Medrol Empfindlichkeits-Studie Nebennieren-Corticosteron-Bestimmung (B) (nach Mattingly 1962, Turner 1964)

Röhrchen	Proben	ml H ₂ O	ml 33 % C ₂ H ₅ OH	Testmenge	60' F. J.	µg B	Total B im Medium	Anzahl NN pro Medium	µgB pro NN
1	Leer	3.0	1.0	0	0				
2	0.4 µgB	2.5	1.0	0.5	30.5				
3	0.8 " "	2.0	1.0	1.0	62				
4	1.2 " "	1.5	1.0	1.5	92.5				
5	* E I	2.0	0	2.0	37	.48	1.20	20	.060
6	E II	2.0	1.0	2.0	48	.63	1.58	18	.088
7	E III	2.0	1.0	2.0	56	.73	1.83	17	.108
8	E IV	2.0	1.0	2.0	56	.73	1.83	16	.114
9	E V	2.0	1.0	2.0	33	.43	1.08	20	.054
10	E VI	2.0	1.0	2.0	48	.63	1.58	20	.079
11	K I	2.0	1.0	2.0	55	.72	1.80	20	.090
12	K II	2.0	1.0	2.0	70	.91	2.28	20	.114
13	K III	2.0	1.0	2.0	57	.74	1.85	18	.103
14	K IV	2.0	1.0	2.0	73	.96	2.40	18	.134
15	K V	2.0	1.0	2.0	58	.76	1.90	20	.095
16	K VI	2.0	1.0	2.0	54	.70	1.75	18	.097

F.J. = Fluoreszenz Intensität

NN = Nebenniere

E = Versuchsgruppe

K = Kontrollgruppe

I = 9⁰⁰; II = 13⁰⁰; III = 17⁰⁰; IV = 21⁰⁰; V = 0⁰⁰; VI = 05⁰⁰.

* alle Nebennieren einer Zeitgruppe wurden gepoolt.
Standardabweichungen können somit nicht angegeben werden.

Anderson, J.A.

In "circadian systems". Report of the 39th Ross
conference on Pediatric research.
Ross Lab.: 54, 1961

Anderson, J.A.

Thermo-variance spectrum in children.
Annals-N.Y. Acad.Sci.: 117, 354, 1964

Aschoff, J.

Zeitliche Strukturen biologischer Vorgänge.
Nova Acta Leopoldina: 21, 147-177, 1959

Aschoff, J.

The pass-angle difference in circadian periodicity.
Circadian Clocks-North-Holland Publishing Co.,
Amsterdam, 1965

Barnum, C.P., C.D. Jardetzky und F. Halberg

Time Relations among metabolic and morphologic
24-hour changes in mouse liver.
Am.J.Physiol.: 195, 301, 1958

Batschelet, E.

Statistical Rhythm Evaluation
Biomathematics Division, Mathematics Institute
University of Zürich, Switzerland, 1965

Batschelet, E.

Statistical methods for the analyses of problems
in animal orientation and certain biological rhythms.
AIBS Monograph, 1965

Belloni, C.

Cortisone therapy synchronized with the circadian
rhythm of the cortico-adrenal excretion.
Rass.Trimestr.Odonto.: 49, 251, 1968

Blackman, R.B. and J.W. Tukey

The measurement of power spectra.
Dover Publ., New York, 1958

Boines, G.J.

Remission in multiple sclerosis following intrathecal methylprednisolone acetate.
 Delaware Med.J.: 33, 230, 1961

Bretzel, H.

Botanische Forschungen des Alexanderzuges.
 Leipzig, 1903

Bricaire, H., J. Leprat, J.P. Luton

Presse Med.: 76, 2157 - 2160, 1968

Bünning, E.

Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion.
 Ber.dtsch.bot.Ges.: 54, 590-607, 1936

Carslaw, H.S.

Introduction to the theory of Furiers series and integrals.
 Macmillan, New York, 1930

Carter, C.W.

The effects of chronic glucocorticoid excess on human connective tissue cells in vivo.
 J.Lab.Clin.Med.: 65, 490, 1965

Chervinsky, R.

Treatment of seasonal allergic rhinitis with long-acting steroid injections, a comparison of four preparations.
 Ann.Allergy: 26, 190, 1968

D'Agata, R., C. DiStephano, C. Furno, L. Mughini

Med.: 68, 652 - 657, 1968

Davis, W.M.

Day-night periodicity in pentobarbital response of mice and the influence of socio-psychological conditions.
 Experientia: 18, 235, 1962

Dawborn, J.K., C. Patalinghug and S.E.L. Black

Estimation of Sodium, Potassium and Chloride in urine using a technicon Auto Analyser.

J.Clin.Path.: 18, 684 - 686, 1965

DiRaimondo, V.C. and P.H. Forsham

Some clinical implications of the spontaneous diurnal variation in adrenal cortical secretory activity.

Am.J.Med.: 21, 321, 1956

DiRaimondo, V.C. and P.H. Forsham

Pharmacophysiologic principles in the use of corticoids and adrenocorticotropin.

Metab.: 7, 5-24, 1958

Dobrokhotoy, V.N., I.V. Markelova, L.K. Sokolova, T.B. Timashkevich, R.I. Nikanorova and A.G. Kurdyumova

Vlenie Vremeni Vvedeniya Sarkolizina na Izmenenie

Mitoticheskoi Aktivnosti Thanei Belykh Krys.

(Effect of the time of injection of Sarkolysin on the Change in Mitotic activity of white tissue).

Regeneral siya i Kletochnoe Razmnozhenie u Zhivotnykh.

(Regeneration and cell division in animals).

Nauka: Moscow 165-185, 1964

Engl.Sum. from REF ZH OTD VYPUSK OBSHCH VOP/PATOL ONKOL, 1965, Nr. 10.53.349

Documenta Geigy

Wissenschaftliche Tabellen

J.R. Geigy AG, Pharma Basel, 1969

Doe, R.P., E.B. Flink and M.G. Flint

Correlation of diurnal variations in eosinophils and 17-Hydroxycorticosteroids in plasma and urine.

J.Clin.Endocrine: 14, 774, 1954

Ertel, R., F. Halberg, F. Ungar

Circadian system phase-dependent toxicity and other effects of Methopyrapone (SU-4885) in the mouse.

J. Pharmacol. and Exper.Therap.: 146, 395-399, 1964

Flack J. D. and M. A. Stockham

The Fluorometric Assay of Corticosterone in the Presence of Cholesterol Background.

Analytical Biochemistry 27, 47-57 (1969)

Falliers, C.J. and S.C. Bukantz

Dexamenthason in childhood asthma.
Annals of Allergy: 17, 887, 1959

Falliers, C.J., L.S. Tany, J. Szentivanyi,
J.R. Jorgenson and S.C. Bukantz

Childhood asthma and steroid therapy as influences
on growth.
Am.J.Dis.Child.: 105, 127, 1963

Fisher, R.A.

On a distribution yielding the error functions
of several well-known statistics.
Proc.Intern.Methem.Congress, Band 2, Toronto:
805, 1924

Forsham, P.H., V. DiRaimondo, D. Island,
A.P. Rinfret and R.H. Orr

Dynamics of adrenal function in man.
In: The human adrenal cortex, ed by G. Wolstenholme
and M. Cameron, Vol. VIII of Ciba Foundation Colloquia
on Endocrinology, Boston, Mass.: 279, 1955

Galicich, J.H., F. Halberg and L.A. French

Circadian adrenal cycle in C-mice kept without food
and water for a day and a half.
Nature: 197, 811, 1963

Good, C.A., H. Kramer and M. Somogyi

The determination of Glycogen.
J.Biol.Chem.: 100, 485, 1933

Grant, S.D., P.H. Forsham and V.C. DiRaimondo

Suppression of 17-Hydroxycorticosteroids in plasma
and urine by single and divided doses of triamcinolone.
New England J.Med.: 273, 21, 1965

Greulich and Pyle

Radiographic atlas of skeletal development of the
hand and wrist.
Standford Univ.Press, Standford/Calif., London:
Oxford Univ. Press, 1964

Guillemin, R. et al.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med.: 101, 394, 1959

Gujer, H.

Der Einfluß von Schlaf, Ruhe und verstärkter Lungen-
ventilation auf das Pneumotachogramm.
Plügers Arch.: 218, 698, 1928,

Günther, R., F. Halberg und E. Knapp

Circadiane Rhythmometrie mittels elektronischer
Rechner zur Beurteilung von Kurwirkungen.
Sanitätsverlag Bad Wörishofen. Symposium II. 106, 1964

Günther, R., E. Knapp und F. Halberg

Referenznormen der Rhythmometrie: Circadiane Acrophasen
von zwanzig Körperfunktionen.
Ztschr.ang.Bäder-Klimaheilk.: 16, 123-153, 1969

Halberg, F.

Some physiological and clinical aspects of 24-hour
periodicity.
Journal-Lancet: 73, 20-31, 1953

Halberg, F.

Physiologic 24-hour periodicity; general and procedural
considerations with reference to the adrenal cycle.
Ztschr.f.Vitamin-Hormone-Fermentforschung: 10, 225, 1959

Halberg, F.

Circadian temporal organization and experimental
pathology.
Ed. Panminverva Medica VII Conferenza Internazionale
Della Società per lo studio dei Ritmi Biologici Inclusa
la Basimetria: 3 - 20, 1960

Halberg, F.

The 24-hour scale: a time dimension of adaptive
functional organization.
Perspectives in Biol.andMed.: 3, 491, 1960

Halberg, F.

Temporal coordination of physiologic function.
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative
Biology, New York, Long Island Biological Ass.:
289 - 310, 1960

Halberg, F.

Temporal coordination of physiologic function.
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.: 25, 289-310, 1960

Halberg, F.

The adrenal cycle and some circadian maps relating
to adrenal function.
Report of the 39th Ross Conference on Pediatric
Research: 57, 1961

Halberg, F.

Circadian (about 24-hour) rhythms in experimental medicine.
Proc.Roy.Soc.Med.: 56, 253 - 256, 1963

Halberg, F.

Grundlagenforschung zur Ätiologie des Karzinoms.
Arztl.Forthb.: 14, 67 - 77, 1964

Halberg, F.

Ritmos y corteza suprarenal.
IV. Simposio panamericano de farmacologia y terapeutica
Mexico.
Excerpta Med.Int.Cong.Ser.: 185, 7 - 39, 1967

Halberg, F.

Ann.Rev.Physiol.: 31, 675 - 725, 1969

Halberg, F.

Chronobiology. Ann.Rev.Physiol.: 31, 675 - 725, 1969

Halberg, F.

Chronobiology and the delivery of health care. Chapter
in a systems approach to the application of chronobiology
in family practice.
O'Leary, J. (Hrsg.) Health Care Research Program,
Dept. of Family Practice and Community Health.
Univ. of Minnesota, Minneapolis: 31 - 96, 1970

Halberg, F., B. Visscher, J.J. Bittner

Relation of visual factors to eosinophil rhythm
in mice.
Am.J.Physiol.: 179, 229 - 235, 1954

Halberg, F., J.J. Bittner, R.J. Gully, P.G. Albrecht, and E.L. Brackney

24-hour periodicity and audiogenic convulsions in I mice of various ages.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med.: 88, 169 - 173, 1955

Halberg, F., J.J. Bittner, R.J. Gully

24-hour periodic susceptibility to audiogenic convulsions in several stocks of mice.

Fed.Proc.: 14, 67 - 68, 1955

Halberg, F., C.P. Barnum, R.H. Silber and J.J. Bittner

24-hour rhythms at several levels of integration in mice on different lighting regimens.

Proc.Soc.Exper.Biol.u.Med.: 97, 897, 1958

Halberg, F. and A.N. Stephens

24-hour periodicity in mortality of C mice from E. coli Lipopolisaccharide.

Federation Proceed.: 17, 1958

Halberg, F., P.G. Albrecht and J.J. Bittner

Corticosterone rhythm of mouse adrenal in relation to serum corticosterone and sampling.

Am.J. of Physiol.: 197, 1083, 1959

Halberg, F., E. Haus and A. Stephens

Susceptibility to Ouabain and physiologic 24-hour periodicity.

Fed.Proc.: 18, 63, 1959

Halberg, F., R.E. Peterson and R.H. Silber

Phase relations of 24-hour periodicities in blood Corticosterone, mitoses in cortical adrenal parenchyma and total body activity.

Endocrinology: 64, 222, 1959

Halberg, F. and A.N. Stephens

Susceptibility to Ouabain and physiologic circadian periodicity.

Proc.Minn.Acad.Sci.: 27, 139, 1959

Halberg, F., P.G. Albrecht and C.P. Barnum

Phase shifting of liver-glycogen rhythm in intact mice.
Am.J. of Physiol.: 199, 400, 1960

Halberg, F., E.A. Johnson, B.W. Brown and J.J. Bittner

Susceptibility rhythm to E. coli endotoxin and bioassay.
Proc.Soc.Exp.Biol., N.Y.: 103, 142 - 144, 1960

Halberg, F., G. Frank, R. Harner, J. Matthews,
H. Aaker, H. Gravem and J. Melby

The adrenal cycle in men on different schedules
of motor and mental activity.
Experientia: 17, 282, 1961

Halberg, F. und H. Panowsky

I.-Thermo-Variance spectra; method and clinical
illustrations.
Experimental Med. and Surg.: 19, 284, 1961

Halberg, F., H. Panowsky, N. Deffley, M. Stein and
G. Adkins

Computer techniques in the study of biologic rhythms.
Ann. N.Y., Acad.Sci.: 15, 695, 1964

Halberg, F., M. Engeli, C. Hamburger and D. Hillman

Spectral resolution of low frequency, small-amplitude
rhythms in excreted 17-Ketosteroids; Probable androgen-
induced circaseptan desynchronisation.
Acta Endocrinologia Periodica, Copenhagen: 103, 5-54, 1965

Halberg, F., R. Engel, R. Swank, G. Seaman, W. Hissen

Cosinor-Auswertung circadianer Rhythmen mit niedriger
Amplitude im menschlichen Blut.
Physik.Med. und Rehab.: 7, 1 - 7, 1966

Halberg, F. and C.J. Falliers

Variability of physiologic circadian crests in groups
of children studied "Transversely".
Pediatrics: 68, 741 - 746, 1966

Halberg, F. und A. Reinberg

J. Physiol. (Paris): 59, 117 - 200, 1967

Halberg, F., Y.L. Tong and E.A. Johnson

Circadian system phase - an aspect of temoral morphology; procedures and illustrative examples. The cellular aspects of biorhythms.

Symposium on Rhythmic Research, VIII. International Congress of Anatomy, Wiesbaden, Springer-Verlag: 19-48, 1967

Halberg, F. und H. Künkel

Ansätze zu einer "mikroskopischen" Rhythmometrie in der Neurologie.

Fschr.Med.: 86, 85 - 90, 1968

Halberg, F., E. Halberg, N. Montalbetti

Premese e sviluppi della cronofarmacologia.

Quad.Med.Sperimentazione Clin.Controllata: 7, 5 - 34, 1969

Halberg, F. et al.

Agreement in endpoints from circadian rhythmometry on healthy human beings living on different continents.

Experimentia: 25, 106, 1969

Halberg, F., E.A. Johnson, W. Nelson, W. Runge and R. Sothorn

Autorhythmometry-procedures for physiologic self-measurements and their analyses.

The Physiology Teacher: 1, 4, 1972

Harter, J.G.

Corticosteroids: their physiologic use in allergic disease.

New York State, J. of Med.: 66, 827, 1966

Haus, E.

Circadian aspects of adrenal reactions to unspecific stimulation and ACTH.

Report of the 39th Ross Conference on Pediatric Research: 64, 1961

Haus, E. und F. Halberg

24-hour rhythm in susceptibility of C-mice to a toxic dose of Ethanol.

J.Appl.Physiol.: 14, 878 - 880, 1959

Haus, E. und F. Halberg

Stage of adrenal cycle determining different corticosterone responses of C-mice to unspecific stimulation and ACTH.

Proc. of the First International Congress of Endocrinology, Copenhagen: 219, 1960

Haus, E. und F. Halberg

Der circadiane Adrenalzyklus und seine Bedeutung für die Reaktionsbereitschaft der Nebennierenrinde.

Wiener Zeitschr. f. innere Med., Urban&Schwarzenberg, 8, 361, 1962

Haus, E. und F. Halberg

Persisting circadian rhythm in glycogen of mice during inanition and dehydration.

Experientia: 22, 113, 1966

Haus, E. und F. Halberg

Circadian acrophase of human eosinophil rhythm in patients with progressive or remitting rheumatoid arthritis, as compared to patients with osteoarthritis and healthy patients.

Rass.Neurol.Veg.: 21, 227, 1967

Haus, E. und F. Halberg

Phase-shifting of circadian rhythms in rectal temperature, serum corticosterone and liver glycogen of the male C-mouse.

Rass.Neur.Veg.: 23, 83 - 112, 1969

Haus, E. und F. Halberg

Environ.Res.: 3, 83 - 106, 1970

Hellbrügge, Th.

The development of circadian rhythms in infants.

"Biological Clocks". Cold Spring Harbor Symp.

Quant.Biol.: 25, 311, 1960

Hellbrügge, Th.

Zeitliche Strukturen in der kindlichen Entwicklung.

Monatszeitschrift Kinderheilkunde: 113, 252, 1965

Hellbrügge, Th., J. Pechstein, R. Ullner, K. Reindl

Zum Verständnis der Periodik-Analyse in der Medizin.
Fortschr.Med.: 85, 289 - 295, 1967

Helmchen, H., H. Künkel und H. Selbach

Periodische Einflüsse auf die individuelle Häufigkeit zerebraler Anfälle.
Arch.Psychiatr.Ztschr.ges.Neurologie: 206, 293, 1964

Hildebrandt, G.

Biologische Rhythmen und ihre Bedeutung für die Bäder- und Klimaheilkunde.
Handbuch der Bäder- und Klimaheilkunde.
Schattauer, Stuttgart: 730 - 785, 1962

Johnson, J.R., B.C. Taylor, F. Morrissey,
J.W. Jenne and F.M. MacDonald

Corticosteroids in pulmonary tuberculosis.
Ann.Rev.Resp.Dis.: 92, 376, 1965

Jones, F., E. Haus und F. Halberg

Murine circadian susceptibility-resistance cycle to Acetylcholine.
Temporal Biology: 31, 1963

Jores, A.

Die Bedeutung der 24-Stunden-Periode in der Biologie und Medizin.
Erg.Innere Med. und Kinderh.: 48, 574, 1935

Kanabrocki, E.L., L.E. Scheving, F. Halberg
R.L. Brewer and T.J. Bird

Circadian variation in presumably healthy young soldiers.
National technical information Service, US Dept. of Commerce, Springfield/Virginia: 22, 151, 1974

Kessler, G. and M. Wolfman

An automated procedure for the simultaneous determination of Calcium and Phosphorus.
Clin.Chem.: 10, 686-703, 1964

Klages, L.

Vom kosmogenen Eros.
1922 Verlag nicht eruierbar

Knapp, M.S., P.M. Keane, J.G. Wright

11-Hydroxycorticosteroid in Plasma bei Gesunden
Brit.Med.J.: 2, 27, 1967

Kuschinsky, G. und H. Lüllmann

Lehrbuch der Pharmakologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1967

Kühl, J.F., T.B. Grage, F. Halberg, G. Rosene,
L. Scheving and E. Haus

Tolerance of Adrenomycin by Bagg Albino Mice
and Fisher Rats depends on circadian timing
of injection.
XI. International Conference, Hannover
Ref.: 26. - 29. Juli 1973

Kreyszig, E.

Statistische Methoden und ihre Anwendung.
Göttingen, 1967

Lange, K.E., E. Wasserman, L.B. Slobody

Prolonged intermittent steroid therapy for nephrosis
in children and adults.
J.A.M.A.: 168, 377, 1958

Marshall, B.Y.

Short-term parenteral corticosteroid therapy for
hay fever and allergic rhinitis.
Practitioner: 194, 676, 1965

Marte, E.

Circadian susceptibility in relation to administration
of pharmacologic agents.
Report of the 39th Ross Conference on Pediatric Research.
52, 1961

Marte, E. und F. Halberg

Circadian susceptibility rhythm of mice to Librium.
Fed.Proc.: 20, 305, 1961

Martin, M.M. and D.E. Hellmann

Temporal variation in Su-4885 responsiveness in man:
evidence in support of circadian variation in ACTH
secretion.

J.Clin.Endocrin. and Metab.: 24, 253, 1964

Martin, M.M., D.H. Mintz

J.Clin.Endocrinol.: 25, 20 - 27, 1965

Mattingly

A simple fluorimetric method for the estimation
of free 11-Hydroxycorticosteroids in human plasma.
J.Clin.Path.: 15, 374 - 379, 1962

Mayersbach, H. von (Hrsg.)

The cellular aspects of biorhythms.
Symposium on Biorhythms, Springer, 1967

Mendle, B. and P. Hoogland

Rapid Determination of blood sugar.
Lancet: 16, 1950

Menzel, W.

Der 24-Stunden-Rhythmus des menschlichen Blutkreislaufes.
Ergeb.Inn.Med.u.Kinderheilk.: 61, 43, 1941

Menzel, W.

Der Tagesrhythmus in seiner Bedeutung für Pathologie
und Klinik.
Klin.Fortbild. Neue Deutsche Klinik: 8, 440, 1944
Ergänzungsband.

Menzel, W.

Krankheit und biologische Rhythmen.
Ärztl.Mitt.: 41, 1201, 1958

Menzel, W.

Menschliche Tag-Nacht-Rhythmik und Schichtarbeit.
Benno Schwabe & Co., Basel: 189, 1962

Menzel, W.

Langwellige Rhythmen bei inneren Krankheiten.
Verhandlungen der Dt. Gesellsch. f. Innere Med.
73. Kongress CLXX: 962, 1967

Mercer, D.M.

Analytical methods for the study of periodic
phenomena obscured by Random Fluctuations.
Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology:
25, 73, 1960

Metre van, T.E. and H.L. Pinkerton

Growth suppression in asthmatic children receiving
prolonged therapy with Prednisone and Methylprednisolone.
J.Allergy: 30, 103, 1959

Migeon, C.J., F.H. Tyler, J.P. Mahoney, A.A. Florentin,
H. Castele, E.L. Bliss and L.T. Samuels.

The diurnal variation of plasma levels and urinary
excretion of 17-hydroxycorticosteroid in normal
subjects, night workers and blind subjects.
J.Clin.Endocrin.: 16, 622, 1956

Mimi, M.E. and L.A. Bovetta

Collagen synthesis and turnover in the growing rat
under the influence of Methylprednisolone.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med.: 117, 618, 1964

Murray, A.B., C. Cook

Measurement of Peak expiratory flow rate in 220 normal
children from 4.5 to 18.5 years of age.
J.Ped.: 62, 186, 1963

Nelson, W. and F. Halberg

Phase relations of circadian rhythms: animals.
In: Handbook of Environmental Biology. Fed.Am.
Soc.Exp.Biol.: 586 - 596, 1966

Nelson, W. and F. Halberg

Effects of a synchronizer phase-shift on circadian rhythms in response of mice to Ethanol or Ouabain. Space Life Sciences: 4, 249 - 257, 1973

Nelson, W. and F. Halberg

An evaluation of time-dependent changes in susceptibility of mice to Pentobarbital injection. Neuropharmacology, Pergamon Press, Great Britain: 12, 509 - 524, 1973

Nichols, T., C.A. Nugent and F.H. Tyler

Diurnal variation in suppression of adrenal function by Glucocorticoids. J.Clin.Endocrin.: 25, 343 - 349, 1965

Nugent, E.H., J. Ward, W.D. MacDermid, J.C. McCall, J. Baucol and F.H. Tyler

Single contrasted with divided daily doses of Prednisolone J.Chron.Dis.: 18, 323, 1965

Panowsky, H. and F. Halberg

II Thermo-variance spectra. Simplified computational example and other methodology. Exp.Med.Surg.: 19, 323, 1961

Pauly, J.E. and L.E. Scheving

Temporal variations in the susceptibility of white rats to Pentobarbital, Sodium and Tremorine. Int.J.Neuropharmacol.: 3, 651, 1964

Perkoff, G.T., K. Eik-Nes, C.A. Nugent, H.L. Fred, R.A. Nimer, L. Rush, L.T. Samuels and F.H. Tyler

J.Clin.Endocrin.: 19, 432, 1959

Pincus, G.

A diurnal rhythm in the excretion of urinary Ketosteroids by young men. J.Clin.Endocrinol.: 3, 195, 1943

Potter, V.R., R.A. Gebert, H.C. Pitot, C. Peraino,
C. Homar, S. Lesher and H. Morris

Systematic oscillations in metabolic activity
in rat liver and in hepatomes.
I.Morris Hepatoma Nr. 7793, Cancer Res.: 26, 2547, 1966

Reinberg, A.

Hours of changing responsiveness in relation to
allergy and the circadian adrenal cycle.
Circadian Clocks-North-Holland Publ.Co., Amsterdam:
214, 1965

Reinberg, A.

Circadiane Rhythmen und allergische Reaktionen beim
Menschen.
Fortschr.d.Med.: 83, 175, 1965

Reinberg, A., J. Ghata and E. Sidi

Nocturnal asthma attacks: their relationship to the
circadian adrenal cycle.
J.of Allergy: 34, 323, 1963

Reinberg, A., E. Sidi and J. Ghata

Circadian reactivity rhythms of human skin to
Histamine or allergen and the adrenal cycle.
J.of Allergy: 36, 273, 1965

Reinberg, A. and E. Sidi

Circadian changes in the inhibitory effects of an
antihistaminic drug in man.
J.Invest.Dermatol.: 46, 415, 1966

Reinberg, A. and F. Halberg

Circadian Chronopharmacology.
Annual Rev. Pharm.: 11, 455, 1971

Reindl, K.

Kombinierte Longitudinal- und Transversalstudien von
Circadian-Rhythmen bei asthmatischen Kindern.
Verhandlungen d. Dt. Ges. f. Inn. Med., J.F. Bergmann:
978-982, 1967. 73. Kongress in Wiesbaden.

Reindl, K., R. Ullner, F. Halberg, Th. Hellbrügge

Effectiveness of Methylprednisolone in mice depends upon the circadian system stage at time of drug administration.

1967, Publication in preparation. Vortrag am Intern.Kongr.über "Rhythmische Funktionen in biologischen Systemen" Wien 8-12.9.75

Reindl, K., C. Falliers, F. Halberg, H. Chai, D. Hillmann and W. Nelson

Circadian Acrophase in peak expiratory flow rate and urinary electrolyte excretion of asthmatic children: Phase shifting of rhythms by Prednisone given in different circadian system phases.

Rass.Neur.Veg.: 23, 5 - 26, 1969

Retiene, K., T. Frohns and F. Schulz

Experimentelle Ergebnisse zur Chronopharmakologie von Corticosteroiden.

Verhandlungen der Dt. Gesellschaft f. Innere Medizin. München, J.F. Bergmann-Verlag: 990 - 993, 1967

Retiene, K., F. Schulz and J. Marco

Circadian rhythmicity of pituitary adrenal function under resting and stress conditions in rats.

Rass.D.Neurol.Veg.: 21, 217, 1967

Robert, A. and J.E. Neramis

Granuloma pouch as routine assay for antiphlegistic compounds.

Acta endocrinol.: 25, 105, 1957

Rose, B.T., Fyler and E. Venning

Corticotrophine, Cortisone and Hydrocortisone in disease of hypersensitivity.

I. Biological corticoid excretion during acute symptoms. J. Allergy: 26, 1, 1955

Rosham, J.H., Van Cauwenberge and J. Lecomte

Excrétion urinaire des corticostéroïdes au cours de certaines réactions et maladies allergiques.

Internat. Arch. Allergy: 9, 102, 1956

Rutenfranz, J., R. Singer

Int. Z. Angew. Physiol. Einschl. Arbeitsphysiol.: 24, 1 - 17, 1967

Sargent, F.S.

The enviroment and human health.
 Enviromental physiology and psychology in arid
 conditions.
 Proc.Lucknow Sym.Arid Zone Res.: 24, 19, 1964

Scalabrino, R., G. Pasquariello

Nozioni attuali ed osservazioni pratiche in tema
 di ritmo dell 'attivita corticosurrenalica e di
 schema di terapia steroidea protratta.
 Reumatismo: 19, 81, 1967

Scheving, L.E. and J.J. Chiakulas

24-hour periodicity in the uptake of tritiated
 Thymidine and its relation to mitotic rate in
 urodele larval epidermis.
 Exp.Cell.Res.: 39 (1), 161-169, 1965

Scheving, L.E.

A circadian susceptibility rhythm in rats to
 Pentobarbital Sodium.
 Anat.Rec.: 160, 741, 1968

Scheving, L.E., E.R. Burns and J.E. Pauly

Phase shifting of the corneal epithelium mitotic
 index rhythm by various drugs.
 XI. International Conference, Hannover:
 Ref. 26. - 29. Juli 1973

Scheving, L.E. and J.E. Pauly

Circadian rhythms: Some examples and comments
 on clinical application.
 Chronobiologia: 1, 3, 1974

Schulz, F. und Retiene, K.

Klin.Wschr.: 42, 198, 1971

Segre, E.J. and E.L. Klaiber

Therapeutic utilization of the diurnal variation
 in pituitary - adrenocortical activity.
 Calif.Med.: 104, 363, 1966

Solem J.H. and T. Brinck-Johnsen

An Evaluation of a method for determination of free Cortico-
 steroids in minute quantities of mouse plasma.
 Scandinavian J. of Clin. & Lab. Invest. 17, Suppl. 80, 1965.

Selye, H.

The stress of life.
Mc.Graw-Hill., Inc. New York, 1956

Serio, M.M., Della Corte, P. Piolanti, S. Romano,
L. Gilioli, G. Giusti

Annales d'Endocrin., Paris, 1970

Silber, R.H.

The biology of anti-inflammatory steroids.
Ann.N.Y.Acad.Sc.: 82, 821, 1959

Silber, R.H. and P.S. Argese

Animal techniques for evaluating adrenocortical drugs.
Clinical Pharmacology: 542, 1970

Smith, E.

Health and Disease.
Walton and Maberly, London: 1861

Smolensky, M., G.S. Pitts, S.S. Stubbs, R.B. Sothorn,
W.L. Nelson, P. Mason, R.B. McHugh, L.M. Cadotte,
and F. Halberg

Circadian rhythm in susceptibility in Methylprednisolone
side effect upon weight gain in immature C-mouse.
Fed.Prod.: 30, 2317, 1971

Sollberger, A.

Studies of temporal variations in biological variates
with special reference to the diurnal rhythm of liver
glycogen and temperature in the chicken and of certain
urinary metabolites in human diabetes.
Suppl. 5th Conf.Biol.Rhythm., Stockholm: 111, 1960

Stiel, R.C.D. and J.H. Torrie

Principles and Procedures of Statistics.
McGraw Hill N.Y., 1960

Straub, H.

Über Schwankungen in der Tätigkeit des Atemzentrums,
speziell im Schlaf.
Dtsch.Arch.Klin.Med.: 117, 397, 1915

Tarquini, B., F. Fantini and M. Cagnioni

Arofia corticosurrenallica da steroides:
Variatione dagli effetti in rapporto all
'oro di somministrazione.
Lo Sperimentale: 116, 373, 1966

Tukey, J.W.

Discussion, emphasising the connection between
analysis of variance and spectrum analysis.
Technometrics: 3, 2, 1961

Turner, D.C.

General Endocrinology
W.B. Saunders, Co., Philadelphia: 316.- 323, 1964

Ungar, F. and F. Halberg

Circadian rhythm in the in vitro response
of mouse adrenal to adrenocorticotrophic hormone.
Science: 137, 1058 - 1060, 1962

Ungar, F. and F. Halberg

In vitro demonstration of circadian rhythm in adreno-
corticotrophic activity of C-mouse hypophysis.
Experientia: 19, 158, 1963

Wacholder, K.

Naturwiss.: 38, 8, 177 - 184, 1952

Walsh, S.D. and J.W.B. Grant

Corticosteroids in treatment of chronic asthma.
Brit.Med.J.: 2, 796, 1966

Wexler, L.

Two controlled studies of a topical steroid
preparation in the treatment of acne vulgaris.
Appl.Ther: 10, 455, 1968

Wright, B.M. and C.B. McKerrow

Maximum forced expiratory flow rate as a measure
of ventilatory capacity.
Brit.Med.J.: 2, 1041 - 1047, 1959

Wyss, R.

Tagesperiodische Schwankungen des Bronchialwiderstandes und ihre praktische Bedeutung.
Verh. der Dt. Gesellsch. f. Innere Medizin,
73. Kongress Wiesbaden
München, J.F. Bergmann: 976 - 977, 1967

Zall, D., D. Fisher and M. Garner

Photometric determination of chlorides in water.
Analytical chemistry: 28, 1665, 1956

Zuchner, J., J.A. Uddin and R.H. Ramsey

Intramuscular administration of steroids in treatment
of rheumatoid arthritis.
Ann.Rheum.Dis.: 23, 456, 1964

Nachwort

Vorliegende Arbeit ist das Werk gemeinsamer Bemühungen.

Dem Direktor der Kinderklinik der Universität München, Herrn Professor Dr. med. B E T K E möchte ich für die Übernahme des Correferates dieser Arbeit danken.

Mein ganz besonderes Anliegen ist es, Herrn Professor Dr. med. H E L L B R Ü G G E zu danken, der mich an die University of Minnesota, USA, zu Herrn Professor Dr. med. H A L B E R G sandte, um dort über Circadianperiodik des Cortisons zu arbeiten.

Herrn Professor H A L B E R G bin ich zu großem Dank verpflichtet für seine großzügige Unterstützung bei allen Untersuchungen und für seinen unermüdlichen Rat.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. med. F A L L I E R S , der mir durch seine Hilfe die schwierigen Untersuchungen bei den asthmatischen Kindern im Children's Asthma Research Institute and Hospital, Denver, ermöglicht hat.

Bei der klinischen Arbeit in Denver haben mich Herr Dr. med. C H A I , bei den chemischen Analysen und tierexperimentellen Untersuchungen Herr Dr. rer.nat. N E L S O N und bei den statistischen Auswertungen Herr H I L L M A N hilfreich unterstützt; ihnen möchte ich danken.

Für das freundliche Entgegenkommen von Herrn Professor Dr. med. Z A N D E R, der mir durch einen Arbeitsurlaub abschließende Untersuchungen an der University of Minnesota ermöglichte, möchte ich mich ebenfalls bedanken.

L E B E N S L A U F

Name : Karl Wilhelm Maria R e i n d l
 Geburtsdatum : 5. März 1940
 Geburtsort : Pilsen/CSSR
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand : ledig

Schulbildung: Volksschule 1946 bis 1951
 Oberrealschule Bad Tölz 1951 bis
 Abitur 1960
 Militärdienst 1960 bis 1962

S t u d i u m:

Universität München WS 1962 bis SS 1968
 University of Minnesota/USA, Medical-
 School, SS-Ferien 1964

University of Minnesota/USA, Medical-
 School und
 Children's Asthma Research Institute
 and Hospital, Denver/Colorado
 März bis Oktober 1966 - Beginn der Dr.-
 Arbeit

University of Minnesota/USA, Department
 of Pathology - Fortsetzung der Dr.-Arbeit
 SS-Ferien 1967

Medizinisches Staatsexamen an der
 Universität München, 12. Dezember 1968

Ärztliche Approbation nach der Medizinal-
 assistentenzeit bei Prof.Dr. B l ö m e r
 und Prof.Dr. M a u r e r am Klinikum
 r.d. Isar, 2. Februar 1970

Praxisvertretung in München, März bis
 Oktober 1970

Weitere Arbeiten im Rahmen der Dr.-Arbeit
 an der University of Minnesota/USA
 März 1973 und Februar 1974

Facharztausbildung an der I.Universitäts-
 Frauenklinik München (Dir.Prof. Dr. J.
 Z a n d e r) seit November 1970.

